

Rok 1930

Tom VIII

Zeszyt 1—4

# ROCZNIKI FARMACJI

ORGAN TOWARZYSTWA POPIERANIA NAUK FARMACEUTYCZNYCH

(„LECHICJA“)

---

## KOMITET REDAKCYJNY:

Prof. dr. Władysław Mazurkiewicz

Prof. dr. Jan Zaleski

Redaktor Odpowiedzialny — Antoni Ossowski

} Redaktorzy

---

## TREŚĆ ZESZYTU 1—4:

*Stanisław Błernacki* *Gentiana asclepiadea* (Goryczka trojeściowa)  
i jej zastosowanie w lecznictwie.

*Witold Goworowski*. Przyczynek do znajomości glukozydów z liści  
*Arctostaphylos uva ursi* L. pochodzenia polskiego.

*F. W. Kudrzycka*. Mikrochemja ziaren skrobi i amyloplastów  
w bulwach ziemniaka — *Solanum tuberosum*.

WARSZAWA 1930

**Towarzystwo Popierania Nauk Farmaceutycznych „Lechicja“**, mieszczące się w gmachu Zakładów Farmaceutycznych Uniwersytetu Warszawskiego (Krakowskie Przedmieście 26/28), ma na celu — „popieranie nauk farmaceutycznych oraz okazywanie pomocy farmaceutom, pracującym na polu naukowym lub chcącym poświęcić się karierze naukowej“ (§ 2 Statutu).

Składka członkowska z prenumeratą „ROCZNIKÓW FARMACJI“ włącznie, uchwalona na nadzwyczajnem ogólnem zebraniu Towarzystwa w dniu 17.X.1924, wynosi:

dla członków wspierających 100 zł. rocznie,  
dla członków zwyczajnych 20 zł. rocznie,  
dla członków nadzwyczajnych 5 zł. rocznie (bez „Roczników Farmacji“).

Wpisowe (jednorazowe) 5 zł.

Składki należy wpłacać sekretarzowi na zebraniach lub wnosić do P. K. O. na konto czekowe 5389.

---

**Adres Redakcji „ROCZNIKÓW FARMACJI“:**  
Warszawa, Uniwersytet, gmach Zakładów Farmaceutycznych, Krakowskie Przedmieście 26/28.

**Adres redaktora odpowiedzialnego:**  
Warszawa, Wolska 10, apteka, telefon 617-50.

ROK 1930

TOM VIII

# ROCZNIKI FARMACJI

(ANNALES DE PHARMACIE)

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA  
POPIERANIA NAUK FARMACEUTYCZNYCH  
(„LECHICJA”)

101655

11

8(1930)

KOMITET REDAKCYJNY:

Prof. dr Władysław Mazurkiewicz

Prof. dr Jan Zaleski

Redaktor odpowiedzialny — Antoni Ossowski

Redaktorzy

Biblioteka Jagiellońska



1003123633

WARSZAWA — 1930

## SPIS RZECZY.

	<i>Str.</i>
<i>Stanisław Biernacki.</i> <i>Gentiana asclepiadea</i> (Goryczka trojeściowa) i jej zastosowanie w lecznictwie . . . . .	I
<i>Witold Goworowski.</i> Przyczynek do znajomości glukozydów z liści <i>Arcto-</i> <i>staphylos uva ursi</i> L. pochodzenia polskiego . . . . .	21
<i>F. W. Kudrzycka.</i> Mikrochemja ziaren skrobi i amyloplastów w bul- wach ziemniaka — <i>Solanum tuberosum</i> . . . . .	29

---



Z ZAKŁADU FARMAKOGNOZJI UNIW. POZNAŃSKIEGO.

Kierownik Zakładu prof. STANISŁAW BIERNACKI.

STANISŁAW BIERNACKI.

## **Gentiana asclepiadea (Goryczka trojeściowa) i jej stosowanie w lecznictwie.**

W lecznictwie jest stosowany korzeń goryczki żółtej pod nazwą *Radix Gentianae*, zwany też *Radix Gentianae rubrae*<sup>1)</sup>, a pochodzący od *Gentiana lutea* L.

Już Trapp<sup>1)</sup> wspomina, iż zamiast korzenia goryczki żółtej zbierają także korzenie innych goryczek jak: *Gentiana purpurea* L. (Gor. szkarłatna), *Gentiana pannonica* Scop. (Gor. węgierska) i *Gentiana punctata* L. (Gor. kropkowana). Wszystkie tu wymienione goryczki mają smak gorzki i co do działania zbliżone są do działania goryczki żółtej.

A. Meyer<sup>2)</sup> badał goryczkę żółtą w kierunku biologicznym, morfologicznym i fizjologicznym, nie pominął także w swoich badaniach porównania w kierunku anatomicznym i chemicznym pomiędzy goryczką żółtą a goryczką kropkowaną, węgierską i szkarłatną. Autor ten poza delikatniejszą budową trzech wymienionych goryczek nie znalazł wybitniejszych różnic w porównaniu z goryczką żółtą. Podobne wnioski autor wysnuwa i co do składu chemicznego tych goryczek. Według Meyera go-

<sup>1)</sup> Tak zwany *Radix Gentianae albae seu Cervariae albae* bywa otrzymywany z *Laserpitium latifolium* L. (Umbeliferae), a *Rad. Gentianae nigrae* z *Peucedanum Cervaria Cussoni* (Umbeliferae) I. Trapp. Farmakognozja. Warszawa, 1869 r. I T. 47—48 str.

<sup>2)</sup> Arthur Meyer. Ueber *Gentiana lutea* und ihre nächsten Verwandten. Archiv d. Pharmacie 221 T. 883 r., 488 i 561 str.

ryczka żółta nie zawiera skrobi tak w asymilujących komórkach jak i w tkankach spichrzowych; z bezazotowych ciał zapasowych występuje tu olej i cukier. Gorzki smak rośliny zeleży (Meyer) od obecności glukozydu Gentiopikryny, rozpuszczonej w soku komórkowym.

Według Meyera surowiec znany pod nazwą „Kadix Gentianae” składa się z podziemnych części, które, o ile są prędko i dokładnie wysuszone, pozostają łamliwe i nadal zachowują barwę białą. Żółte i brunatne zabarwienie występuje przy powolnem suszeniu lub przy dłuższem przechowywaniu wilgotnego korzenia, wskutek rozkładu treści komórek; wtedy też występuje właściwy zapach korzenia.

Wszystkie lekospisy wymieniają jako oficynalny korzeń goryczki żółtej — *Gentiana lutea* L.

Lekospisy Francji, Anglii, Belgji, Włoch, Grecji i Stanów Zjednoczonych poprzestają na tym jednym gatunku.

Inne natomiast lekospisy jak: niemiecki, austriacki, rosyjski (VI wydanie), norweski, szwedzki, szwajcarski i serbski, a także materiały do Farmakopei polskiej <sup>3)</sup> wymieniają oprócz *Gentiana lutea* i inne gatunki goryczek, których korzenie obok korzeni goryczki żółtej mogą być używane jako surowiec oficynalny.

Z innych gatunków goryczek wyżej wymienione lekospisy wymieniają: *Gentiana purpurea* L. (gor. szkarłatna), *Gentiana pannonica* Scop. (gor. węgierska) i *Gentiana punctata* L. (gor. kropkowana). Lekospis austriacki natomiast wymienia tylko *Gentiana pannonica* obok *Gentiana lutea*.

Z wymienionych goryczek występują w Polsce *Gentiana lutea* L. i to niezbyt często na łąkach wysokogórskich w Tatrach i Karpatach Pokuckich <sup>4)</sup> na piaskowcach, łupkach łuszczkowych i wapieniach. *Gentiana punctata* <sup>4)</sup> L. jest w Polsce rośliną rzadką i występuje w Sudetach, Karpatach i Tatrach na trawiastych i kamienistych zboczach na granitach, piaskowcach i łupkach, rzadko zaś na wapieniach. *Gentiana purpurea* i *Gen-*

<sup>3)</sup> Prof. J. Muszyński. Prace podkomisji Farmakognostycznej. Warszawa, 1928 r., 118 str.

<sup>4)</sup> A. J. Zmuda. Polskie gatunki Goryczki. Kraków, 1910.

tiana pannonica spotykają się w Polsce bardzo rzadko i o nich nie wspomina ani prof. W. Szafer <sup>5)</sup> ani A. J. Żmuda.

Nie wymieniana w lekospisach *Gentiana asclepiadea* L. (goryczka trojeściowa) jest bodaj najpospolitszą polską goryczką, rosnącą w większych ilościach na gruntach wilgotnych, wapiennych, obfitujących w próchnicę, w lasach, na polanach, porębach, po krainę kosodrzewiny. Według prof. W. Szafera jest ona częstą na Podkarpaciu i w Karpatach, w Ojcowie, na Łysych Górach, koło Lwowa i Warszawy. Według René Osterwaldera <sup>6)</sup> *Gentiana asclepiadea* jest pospolitą na całym pogórzu łańcucha Alp, sięgając niekiedy do 2000 metrów nad poziom morza. Występuje też goryczka trojeściowa w Wogezach i w Górach Olbrzymich.

W Zakopanem wszędzie spotykałem goryczkę trojeściową pod reglami, na drodze do Morskiego Oka, jak również w dolinach: Strążyskiej, Kościeliskiej i Chochołowskiej.

Obok goryczki trojeściowej najpospolitszą jest w Polsce *Gentiana verna*, jednak z powodu swoich nikłych wymiarów nie może ona być brana pod uwagę do celów leczniczych. Dość pospolitą jest *Gentiana cillata*, lecz z powodu niezbyt obficie rozwiniętego systemu korzeniowego nie może być także brana pod uwagę. Goryczka trojeściowa natomiast posiada znacznie rozwinięty system korzeniowy, szczególnie u starszych osobników, u których spotykałem korzeń grubości do 3 centymetrów i długi do 1 metra. Obfitość goryczki trojeściowej w Tatrach, Beskidach i Karpatach nasunęła mi myśl, czy korzeniami tej goryczki nie dałoby się zastąpić, jeżeli już nie całkowicie, to przynajmniej częściowo, „sprowadzanego z zagranicy korzenia goryczki żółtej i występujących u nas w niewielkich ilościach gatunków goryczek, wymienianych w lekospisach. A sprowadzamy tego surowca dość dużo. Według moich informacji, zasięgniętych w jednej tylko firmie „L. Spiess i Syn” w Warszawie, ilość sprowadzanego przez tę firmę korzenia goryczki dochodzi do 6000 kilogramów rocznie, co przy cenie 3 złotych za kilogram stanowi sumę 18.000 złotych w przywozie jednego tylko surowca.

<sup>5)</sup> Prof. W. Szafer. Rośliny polskie. Lwów — Warszawa, 1924 r. 560 str.

<sup>6)</sup> René Osterwalder. Beiträge zur Kenntniss pharmaceutisch wichtiger *Gentiana* Wurzeln. Wohlen. 1919 r. 56 str.

O użyciu lekarskiem korzenia goryczki trojeściowej mamy zaledwie wzmiankę u Tschirch<sup>7)</sup>, który zalicza korzeń tej goryczki do surowców równoznacznych (Paralleldrogen). Tschirch wspomina też, iż w latach 70-tych ubiegłego stulecia i w latach 1902—1903 w handlu Wiedeńskim znajdowały się korzenie tej rośliny pod nazwą: „Radix Gentianae cruciatae” jako surowiec zastępczy korzeni goryczki żółtej. René Osterwalder<sup>8)</sup> w pracy swej nadmienia, iż korzeń goryczki trojeściowej jest o połowę mniej gorzkim od korzenia goryczki żółtej, co może stać w związku z nikłą ilością oleju o bardzo gorzkim i wstrętnym smaku. Według tegoż Osterwalder’a, smak korzeni goryczki szkarłatnej jest o wiele bardziej gorzki od korzeni goryczki żółtej.

Jakkolwiek korzenie goryczki trojeściowej nie są wymienione w żadnym lekospisie, to jednak w lecznictwie ludowym bywają one stosowane przy febrach. W Małopolsce wschodniej ludność nazywa goryczkę trojeściową „Świczky”.

W świeżych korzeniach goryczki żółtej znalazł Kromayer<sup>9)</sup> glukozyd smaku gorzkiego, w ilości około 0,13%, nazwany przez niego gentiopikryną.

Korzenie goryczki żółtej badali też Bourquelot i Herissey<sup>10)</sup> i Tanret<sup>11)</sup>. Pierwsi dwaj badacze znaleźli w świeżych korzeniach także glukozyd gentiopikrynę w ilości 1,13%, a Tanret w suchym wyciągu ze świeżych korzeni nawet w ilości 7%.

Goryczkę trojeściową badał M. Bridel<sup>12)</sup> i w świeżym korzeniu takowej znalazł także glukozyd gentiopikrynę w ilości 1%. Według M. Briedel’a glukozyd gentiopikryna ma się znajdować i w korzeniach innych gatunków goryczek, jak: *Gentiana cruciata*, *Gentiana Punctata*<sup>13)</sup>, *Gent. pneumonanthe*

7) Prof. A. Tschirch. Handbuch der Pharmakognosie. 1917 rok II tom. 2 część, 1599 str.

8) René Osterwalder. Beiträge zur Kenntniss pharmazeutische wichtigen *Gentiana* Wurzeln. Wohlen 1919 r., str. 8.

9) A. Kromayer. Archiv d. Pharmacie Hannover, 1862 r., 27 str.

10) E. Bourquelot i H. Herissey. Comptes Rendus de l’Academie des Sciences, 1900 r., T. 131, str. 114.

11) G. Tanret. Comptes Rendus de l’Academie des Sciences 1905 r., T. 141, str. 207.

12) Marc Bridel. Comptes Rendus de l’Academie des Sciences 1912, T. 155, str. 1029—1164.

13) Marc Bridel. Comptes Rendus 1913 r., 627 str.



i *Gent. germanica* a nawet w gatunkach *Swertia perennis* (vivacea)<sup>14)</sup> i *Chlora perfiliata*<sup>15)</sup>. Natomiast brak gentiopikryny w gatunkach: *Gentiana acaulis*, *Gentiana nivalis*, *Gent. campestris* i *Gent. tennela*.

W badanych korzeniach goryczki trojęściowej znalazł. M. Bridel<sup>12)</sup> oprócz 1% gentiopikryny, także gentianozę (2 gramy) i sacharozę.

Podane powyżej wyniki odnoszą się do gatunków goryczek rosnących w Szwajcarii. Polskich goryczek nie badał w tym kierunku jeszcze nikt dotąd.

Chcąc się przekonać, czy korzenie goryczki trojęściowej, rosnącej w Polsce obficie, mogą zastąpić korzenie innych gatunków goryczek, rosnących w Polsce w niewielkiej ilości, a sprowadzanych dotąd z zafrancy jako surowiec, należało zbadać ilość gentiopikryny w korzeniach goryczki trojęściowej, i to w czasie, kiedy tego glukozydu jest najwięcej, biorąc również pod uwagę warunki klimatyczne i podłoże.

Według M. Briedel'a<sup>16)</sup> najwięcej gentiopikryny znajduje się w korzeniach goryczki żółtej w czerwcu i lipcu i wtedy, jego zdaniem, należy ją zbierać. W szybko wysuszonych korzeniach goryczki żółtej w czerwcu autor ten znalazł do 6,5% gentiopikryny.

Jeszcze w 1925 roku otrzymałem z Departamentu Nauki i Szkół Wyższych Ministerstwa W. R. i O. P. zasiłek w kwocie 300 zł., za który składał na tem miejscu podziękowanie P. Dyrektorowi Departamentu P. Michalskiemu. Zasiłek ten umożliwił mi wyjazd do Zakopanego w celu zebrania goryczki trojęściowej. Koło połowy sierpnia zebrałem w dolinie Kościeliskiej dość znaczną ilość tej goryczki wraz z korzeniami, które po obłaniu na miejscu wysokim przewiozłem do Poznania. Z przyczyn odemnie niezależnych nie mogłem uzyskanego tą drogą materiału należycie wykorzystać i musiałem poprzestać tylko na czę-

---

<sup>14)</sup> M. Bridel. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1910 r., I T., str. 109.

<sup>15)</sup> E. Bourquelot. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1910 r., 7 serja, II T., 149 str.

<sup>16)</sup> Marc Bridel. *Application de la methode Biochimique à une nouvelle étude des preparations galeniques de la racine de gentiane*. Lons-le-Saunier, 1911, str. 56.

ści anatomicznej. Drugą część pracy wykonałem już w 1929 roku, kiedy otrzymałem od Zarządu Polskiego Powszechnego Tow. Farmaceutycznego Oddział w Poznaniu, zasiłek w kwocie 500 zł., za co na tem miejscu składam podziękowanie Szan. Zarządowi poznańskiego oddziału P. P. T. F. Zasiłek ten pozwolił mi wyjechać w połowie lipca 1929 r. do Zakopanego i innych miejscowości, celem zebrania dostatecznej ilości świeżego materiału do dokończenia rozpoczętej pracy.

Jak już wspomniałem, spotykałem w dolinie Kościeliskiej piękne okazy goryczki trojeściowej sięgające 80 cm wysokości i posiadające korzenie do 3-ch centymetrów grube i około metra długie. Taki właśnie okaz, znaleziony w wyżej wspomnianej dolinie przedstawia rys. 1. Z węzłowego, rozgałęzionego kłącza, wyrasta kilka łodyg, zwykle łukowato pochylonych, co nadaje roślinie krzaczasty wygląd.

Łodygi są okrągłe, nagie, na wysokości 10 — 15 cm są ulistnione, podłużnie prążkowane, wewnątrz puste. Liście płasko dwustronnie ułożone, siedzące lub też bardzo krótko ogonkowe, są one jajowato lancetowate, na wierzchołku długo zaostrome, a u nasady nieco sercowato wycięte. Liście są nagie, cienkie, całobrzegie, do 13 cm długie i 3,5 cm szerokie, barwy żywo zielonej. Z wydatnego nerwu głównego odchodzi 3—5 nerwów bocznych i dalsze rozgałęzienia tworzą wyraźną siateczkę. Liście są zbudowane według typu dwustronnego (bifacialis) z prążkowanym grubym naskórkiem (cuticula). Tkanka palisadowa jednorzędowa; tkanka gąbczasta z dużymi przestrzeniami międzykomórkowymi. W komórkach miękiszu obficie występują małe tafelkowate, pryzmatyczne lub igiełkowate kryształki szczawianu wapniowego.

Wiązki sitowo-naczyniowe dwuoboczne zabezpieczone od góry i od dołu zwarcicą, a około nerwu głównego i włóknami. Mniej więcej od połowy wysokości łodygi w kącie każdego liścia znajduje się jeden długorurkowaty kwiatek, osadzony na krótkiej szypułce. Kielich rurkowato - dzwonkowaty, 5-zębny, o działkach krótszych od rurki. Korona lejkowato-dzwonkowata barwy ciemno-niebieskiej z rurką jaśniejszą. Korona wewnątrz prążkowana, a między prążkami nakrapiana. Pręcików pięć o pylnikach zlepionych dookoła szyjki słupka.

Kłacza szczególnie starszych okazów są gałęziste do 5 — 7 cm., nawet dłuższe i do 2 cm. grube, barwy z zewnątrz żółtej lub żółto-brunatnej, pierścieniowato pomarszczone. Wierzchołek kłacza jest zwykle wielogłowy i często widełkowato rozga-



Rys. 1.

łęziony. Pączek zwykle jeden, rzadziej dwa lub więcej, przytulony jest do nasady łodygi.

W przekroju poprzecznym kłacza, pod lupą, widoczna jest niewielka biaława część korowa, otaczająca żółtawą część drzewną i zwykle ekscentrycznie ułożony rdzeń. W części drzewnej widoczne są liczne pęczki włókien, otaczające rdzeń.



System korzeniowy jest znacznie rozwinięty. Korzenie świeżo wykopane ze starszych osobników są 3 — 3,5 cm. grube i do jednego metra długie. Korzenie są okrągłe, mięsiste barwy jasno-żółtej, połyskujące i gładkie. Starsze korzenie są nieco ciemniejszej barwy. Od korzenia głównego odchodzą liczne korzenie boczne. Na przekroju poprzecznym widoczna jest białawo-żółta szeroka część korowa. Linja miazgi jest dość wyraźnie widoczną i oddziela słomkowo-żółtą, promienisto zbudowaną część drzewną i wreszcie dość gruby rdzeń barwą zbliżony do części korowej.

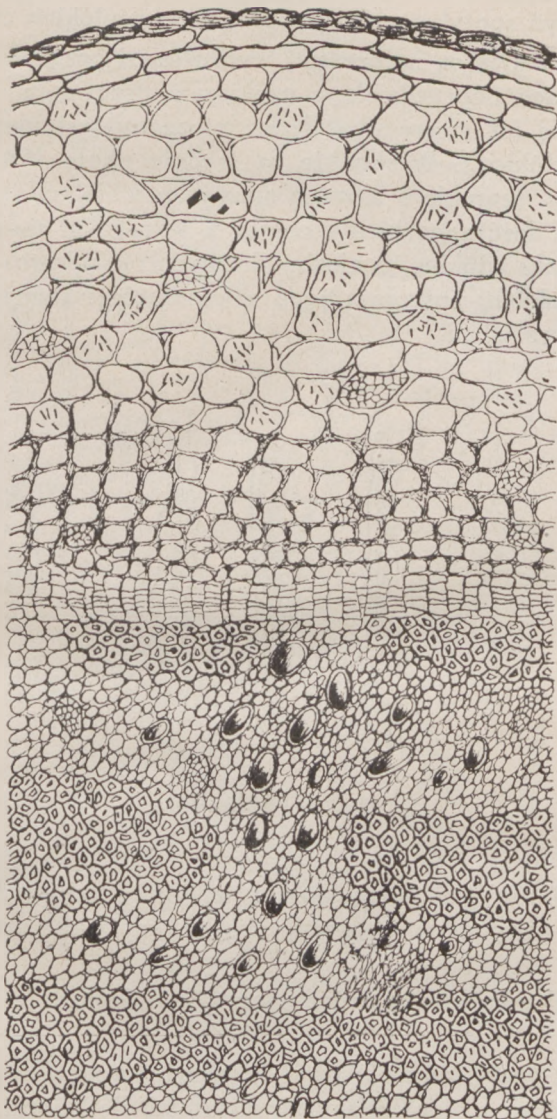
Surowiec stanowią szybko i dokładnie suszone kłącza i korzenie. Kłącza są barwy żółtej lub żółto-brunatnej, twarde, pierścieniowato pomarszczone i szczególnie u starszych osobników opatrzone podłużnymi zmarszczkami. Dobrze oczyszczony i wysuszony korzeń jest zwykle nieco skręcony, podłużnie bruzdowaty, barwy jasno-żółtej. W pewnym oddaleniu od kłącza korzeń daje się krajać z łatwością i w tym miejscu złam korzenia jest równy. Po namoczeniu w wodzie, wysuszony korzeń znacznie pęcznieje, powiększając swoją obojętność. Zapach surowca jest właściwy i dość znaczny. Smak początkowo słodkawy, następnie i gorzki. Korka brak nawet w starszych kłączach i jednorzędowa gruba skórka o błonach skorkowaciałych okrywa kłącze. Komórki skórki wydłużone są w kierunku stycznym i poprzedzielane są pionowymi przegódkami skorkowaciałowymi w mniejszym stopniu<sup>17)</sup>.

Leżące pod skórą komórki podskórni o błonach zgrubiałych, wydłużone są także w kierunku stycznym kłącza. Komórki miękiszu korowego są okrągławe z błonami dość cienkimi, ułożone są dość luźno i tworzą przestrzenie międzykomórkowe (rys. 2). Prawie wszystkie komórki miękiszowe zawierają drobne igielkowate lub tafelkowate kryształki szczawianu. Bliżej cambium (miazgi) występują pasma zwarcicy (collenchym) znacznej grubości. W pobliżu miazgi są dość liczne grupy sit. Takież grupy sit znajdujemy i w części drzewnej, a także w pobliżu zwykle ekscentrycznie położonego rdzenia. Promienisto ułożone siateczkowate i listewkowate naczynia średnio 132  $\mu$  długie i 38  $\mu$

---

<sup>17)</sup> Zabarwienie tych komórek od Sudanu III po uprzednim wytrawieniu Eau de Javelle jest mniej intensywne od błon zewnętrznych.

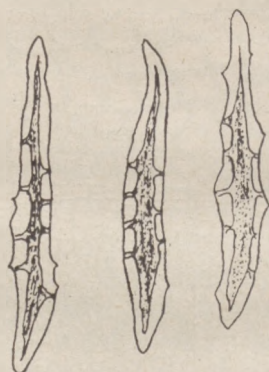




Rys. 2.  
Przekrój poprzeczny przez kłącze.

szerokie łączą się pochyłymi przegródkami. Pomiędzy promieniami naczyń spotykamy kilkorzędowe pęki włókien drzewnych.

Pęki włókien są najczęściej wydłużone i przebiegają w kilku warstwach poprzedzielane miększym drzewnym, w którym znajdują się też grupy sit. Rdzeń otoczony jest nieprzerwaną warstwą włókien. Włókna te są średnio około 198  $\mu$  długie i około 27  $\mu$  szerokie o błonach niezbyt zgrubiałych, świetle komórkowym dość znacznym i często z wyraźnym uwarstwieniem. Ścianki włókien, o niezbyt licznych okrągławo — wydłużonych jamkach, posiadają tępe zakończenia i tworzą czasami wyrostki (rys. 3).



Rys. 3. Włókna

Skrobi nie znalazłem wcale; w komórkach mięsistowych występują wspomniane wyżej drobne kryształki szczawianów wapna.

Cała tkanka łączy prócz naczyń i włókien daje reakcję na błonnik.

Nawet grube korzenie (rys. 4), okryte są nazewnątrz grubościenną skórą z błonami skorkowaciałymi. Podskórnia kilkorzędowa zbudowana z komórek wydłużonych w kierunku stycznym ze zgrubiałymi ściankami. Komórki podskórni poprzedzielane są pionowymi cienkimi ściankami. Znajdujący się poniżej mięsisk zbudowany jest z komórek okrągławych o ściankach dość grubych. Prawie każda komórka mięsisku zawiera liczne drobne





Rys. 4.  
Przekrój poprzeczny przez korzeń.

igiełkowate lub tafelkowate kryształy szczawianów wapna co szczególnie dobrze widać na przekrojach podłużnych. Komórki miększu korowego są wydłużone w kierunku podłużnym i mają ścianki, szczególnie w okolicy sit, paciorkowato zgrubiałe. W komórkach miększu często widoczne jest jądro. Komórki ułożone są luźno i tworzą przestrzenie międzykomórkowe. W miększu porozrzucane są grupy sit.

Rurom sitowym towarzyszą, szczególnie w starszych korzeniach włókna zastępcze o błonach niezdrewniałych. Włókna te posiadają czasami ścianki z charakterystycznym rysunkiem w postaci delikatnych kresek przecinających się i tworzących nieco skośną siateczkę. W pobliżu miazgi, szczególnie w grubszych korzeniach, znajdujemy 1 — 2 warstwy zwarcicy, która niekiedy otacza miazgę nieprzerwanym pasmem. Za kilkorzędową miazgą naczynia ułożone są promienisto, często jednak promienie naczyń poprzerywane są grupami włókien. Takie grupy włókien spotykamy w kilku rzędach pomiędzy promieniami naczyń. Takich warstw włókien może być kilka. Ilość warstw włókien i ich grubość zależną jest od odległości od kłącza i od grubości korzenia. Im dalej od kłącza, tem tych grup włókien jest mniej i warstwy ich są cieńsze, i wreszcie giną całkowicie i korzeń *Gent. asclepiadea* nie różni się niczem od korzenia *Gent. lutea*. Przy długości korzenia, wynoszącej 18 cm. na odległości 8 cm., kończą się włókna.

Rdzeń otoczony jest często zwarcicą. W rdzeniu trafiają się niewielkie naczynia pierwotne, otoczone komórkami ułożonymi promienisto.

W komórkach miększowych są drobne kryształy szczawianów wapna i niezbyt obfite kropelki tłuszczu. Skrobi nie zauważyłem.

Za wyjątkiem naczyń i włókien cała tkanka barwi się od jodu z kwasem siarkowym i chlor-cynk-jodu na niebiesko. Kwas osmowy barwi kropelki tłuszczu na kolor ciemno-brunatny (czarny).

Proszek sporządzony z korzenia goryczki trojeściowej jest barwy żółto-szarawej i różni się znacznie od szaro-brunatnej barwy proszku korzenia goryczki żółtej. Badany pod drobnowidzem różni się obecnością wspomnianych włókien, brakiem korka i obecnością zwarcicy.



Jak powiedziano wyżej w świeżym korzeniu goryczki żółtej znajduje się glukozyd gentiopikryna (wykryta przez Kromayera) o smaku bardzo gorzkim. Według Mayera<sup>18)</sup> smak gorzki rośliny zależy od obecności tego glukozydu rozpuszczonego w soku komórkowym. Tego samego zdania jest i Kromayer. W świeżych korzeniach Goryczki trojeściowej, pochodzącej ze Szwajcarii, znalazł Bridel tenże glukozyd Gentiopikrynę w ilości nie mniejszej niż w korzeniu Goryczki żółtej.

Jeśli przyjmiemy i uda się stwierdzić, że wartość lecznicza korzeni Goryczki żółtej i preparatów z niej zależną jest od gentiopikryny, to ilość tej ostatniej winna odgrywać decydującą rolę jak w użyteczności, tak i w oznaczaniu dobroci, jak samego surowca, tak i preparatów przygotowanych z tegoż surowca. Rzecz naturalna, że surowiec sam tak ma być suszonym, iżby stracił jaknajmniej ze swoich ciał czynnych.

W celu przekonania się, czy korzeń Goryczki trojeściowej, pochodzenia polskiego, może zastąpić korzeń Goryczki żółtej, sprowadzonej ze Szwajcarii oznaczałem ilościowo glukozyd gentiopikryny w świeżych korzeniach Goryczki trojeściowej, pochodzących z różnych okolic Polski, a mianowicie z Małopolski wschodniej, z okolic Kosmacza, z okolic Sanoka i z okolic Zakopanego. Rezultaty oznaczeń ilościowych gentiopikryny w świeżych korzeniach *Gentiana asclepiadea* L. zebrane są w tablicy I. Dla porównania w tejże tablicy zebrane są ilości gentiopikryny, otrzymane przez różnych autorów z korzeni różnych gatunków goryczki.

Jak widać z tablicy ilość gentiopikryny krystalicznej w kłączach i korzeniach *Gent. asclepiadea* L. polskiego pochodzenia przedstawia się bardzo dobrze w porównaniu do surowców szwajcarskich. Jeżeli przeto uważać gentiopikrynę za ciało czynne goryczek, to goryczka trojeściowa może być z powodzeniem stosowana zamiast korzeni goryczki żółtej sprowadzanych ze Szwajcarii.

Wprawdzie Osterwalder w swej pracy czyni uwagę, że korzeń goryczki trojeściowej jest o połowę mniej gorzki od korzenia goryczki żółtej, należałoby zatem używać go dwa razy

---

<sup>18)</sup> A. Meyer über *Gentiana lutea* und ihre nächsten Verwandten. Archiv d. Pharmacie 21 T. 1883 r. 488 i 561 str.

## TABLICA I.

*Korzeń.*

Autor	Gatunek goryczki	Pochodzenie korzeni i czas zbioru	Ilość zużytego świeżego korzenia	Ilość otrzymanej krystalicznej Gentianiny w %	Metoda stosowana do otrzymania
1. Kromayer	<i>Gentiana lutea L.</i>	Szwajcaria początek sierpnia	6 funtów korzeni	0,13	własna
2. Bourquelot	<i>Gentiana lutea L.</i>	Szwajcaria wrzesień—październik	22 kilo korzeni	1,13	własna
3. Tauret	<i>Gentiana lutea L.</i>	nie podano	1 kilo suchego wyciągu	7,00	własna
4. Bridel	<i>Gentiana punctata L.</i>	Szwajcaria	1 kilo korzeni	0,90	Bourquelot-Tauret
5. Bridel	<i>Gentiana asclepiadea L.</i>	Lautoret 15 sierpnia	400 gram. korzeni	1,00	Bourquelot-Tauret
6. Biernacki	<i>Gentiana asclepiadea L.</i>	Zakopane 17 lipca 29 r.	4470 gram. korzeni	1,48	Metoda Bourquelot-Tauret z własną modyfikacją
7. Biernacki	<i>Gentiana asclepiadea L.</i>	Sanok 20 sierp. 28 r. 30 lipca 29 r.	1000 gram. 527 gram. korzeni	1,21 1,06	
8. Biernacki	<i>Gentiana asclepiadea L.</i>	Kosmacz 17 lipca	650 gram. korzeni	0,25	
Kłęczka					
9. Biernacki	<i>Gentiana asclepiadea L.</i>	Zakopane 17 lipca	2250 gram. kłęczki	1,39	
Łodyga					
10. Biernacki	<i>Gentiana asclepiadea L.</i>	Zakopane 17 lipca	500 gram.	0,32	

UWAGA: Nr. 6 i 9. Korzenie obrabiane były na drugi dzień po zebraniu t. j. 18-go lipca 1929 r.

Nr. 8. Korzenie były w drodze 5 dni.

Nr. 7. Korzenie obrabiane były na miejscu na drugi dzień po zebraniu.

więcej niż korzenia goryczki żółtej. Osterwalder przypuszcza, iż przyczyną tego jest nikła ilość t. zw. oleju o gorzkim i ostrym smaku.

Do otrzymywania gentiopikryny zastosowałem metodę kombinowaną Bourquelot—Tauret z własną modyfikacją. Modyfikacja polegała na rozpuszczeniu, wyparowanego (*in vacuo*) wyciągu wysokowego (otrzymanego metodą Bourquelota), w niewielkiej ilości wody i mieszaniu mętnego wodnego roztworu z eterem etylowym w celu oddzielenia żywic, tłuszczu, ciał barwiących oraz glukozydu gentiiny (rozpuszczalnej w eterze etylowym). Wodny roztwór po odparowaniu (*in vacuo*) obrabiano następnie za pomocą eteru octowego (Tauret). W ten sposób otrzymałem masę krystaliczną, jednak jeszcze zabarwioną, którą oczyszczałem przez przekrystalizowanie z bezwodnego wysoku i przemywanie bezwodnym wysokiem oraz małą ilością eteru etylowego.

Otrzymana gentiopikryna miała wygląd bezbarwnej masy krystalicznej, którą po wysuszeniu ważyłem.

W celu otrzymania zupełnie czystej gentiopikryny wysuszoną masę krystaliczną wyczerpywałem wrzącym eterem octowym, zawierającym 2% wody. Po ostudzeniu wydzielają się kryształy zupełnie czystej gentiopikryny.

Otrzymana w ten sposób czysta gentiopikryna w postaci bezbarwnych igiełkowatych kryształów o smaku gorzkim rozpuszczała się bardzo łatwo w wodzie jak również w wysoku zawierającym wodę. Wrzący bezwodny wysok rozpuszczał otrzymaną gentiopikrynę całkowicie, po ostudzeniu jednak roztworu wydzielają się kryształy gentiopikryny. Temperatura topliwości otrzymanej gentiopikryny z wodą krystalizacyjną (<sup>1</sup>/<sub>2</sub> cz.) wskazywała 121° C., po stracie wody krystalizacyjnej drugi punkt topliwości wynosił 191° C.

Według Kromayera gentiopikryna rozpuszcza się bezbarwnie w stężonym kwasie siarkowym, po ogrzaniu bezbarwnego roztworu występuje karminowo-czerwone zabarwienie. Stężony HCl rozpuszcza bezbarwnie gentiopikrynę, po ogrzaniu tego roztworu występuje żółte zabarwienie. Amonjak rozpuszcza gentiopikrynę bezbarwnie, po ogrzaniu bezbarwnego roztworu występuje cytrynowo-żółte zabarwienie. Wszystkie te 3 Kromaye-

rowskie reakcje z otrzymaną gentiopikryną wypadły pozytywnie.

Prócz tego wykonałem jeszcze reakcje podane u Abderhalden'a, a mianowicie: Gentiopikryna rozpuszcza się w stężonym kwasie siarkowym bezbarwnie; po dodaniu do tego roztworu sproszkowanego molybdenianu amonowego, po upływie 20 min. zaczęło występować niebieskie zabarwienie i stopniowo cały płyn zabarwił się na niebiesko.

Bezbarwny roztwór gentiopikryny w stężonym kwasie siarkowym po dodaniu  $\text{ZnCl}_2$  po upływie pół godziny zabarwił się na kolor czerwony <sup>19)</sup>, trwały.

Z pochodnych gentiopikryny otrzymałem pochodną ołowio-  
wą w postaci białawo-żółtego osadu (w amoniakalnym roztworze od plumbum aceticum) z zawartością ołowiu 62,18% i t. zw. pentacetylgentiopikrynę (z bezwodnikiem kwasu octowego i  $\text{ZnCl}_2$ ), która przekrystalizowana z wysoku posiadała temperaturę topliwości 141° C.

Po ogrzaniu z rozcieńczonym kwasem siarkowym, jak również pod wpływem emulsyny następowała hydroliza i, nierozpuszczalna w wodzie gentiogenina, rozpuszczona w stężonym kwasie siarkowym, zabarwiła się na brunatno, a po dodaniu wody wystąpiło niebieskie zabarwienie. Elementarna analiza wysuszonej gentiopikryny dała:

0,1316 gr. substancji dało 0,2484 gr.  $\text{CO}_2$   
i 0,0716 gr.  $\text{H}_2\text{O}$

$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_9 + \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$  wymaga 52,58% C i 5,8% H.  
stwierdzono 52,70% C i 6,09% H

Wobec wszystkich zgodnych wyników nie wykonywałem analizy elementarnej po raz drugi.

Korzeń goryczki (żółtej) stosowany jest w lecznictwie w postaci proszku, nalewki, wyciągu gęstego jako constituens do przyrządzania pigułek i wreszcie do sporządzania likierów żołądkowych.

<sup>19)</sup> Prof. E. Abderhalden: Biochemisches Handlexicon II T., str. 659.



W materjałach do lekospisu polskiego oficynalnym jest sam surowiec, proszek z niego i wyciąg.

Takie same preparaty znajdują się w lekospisie niemieckim VI.

Lekospis francuski obejmuje prócz tego sirupus gentianae i vinum gentianae.

Samo suszenie korzenia (goryczki żółtej) jak przygotowywanie wartościowych pod względem zawartości glukozydów niezhydrolizowanych było przedmiotem badań Marca Bridel'a i Ch. Bégüina<sup>20)</sup>. Ch. Bégüin dochodzi do przekonania, że suszenie korzenia winno się odbywać możliwie prędko w dobrze przewietrzanem miejscu w t. 32°. Przygotowywanie preparatów na zimno daje mniej wartościowe preparaty pod względem zawartości glukozydów. Natomiast prędką perkolacja jest według Bégüin'a najlepszą metodą przyrządzania preparatów.

Marc Bridel<sup>21)</sup> stwierdza, iż nalewki, wyciągi, wina i ulepek, przyrządzone z korzenia goryczki żółtej przez macerację surowca nie zawierają gentiopikryny prawie wcale, natomiast preparaty przyrządzane przez wymywanie (ługowanie — lixiviation—) za pomocą wrzącego alkoholu nawet 60% zawierają takową. Wobec tego, jeżeli byłoby stwierdzone, iż wartość korzeni goryczki zależy od obecności gentiopikryny, wszystkie preparaty przyrządzone być winny na wrzącym wysoku i to z korzeni wysuszonych prędko i dokładnie, a nie poddanych uprzednio fermentacji. Wtedy otrzymać możemy preparaty wartościowe, zawierające gentiopikrynę.

Ten pogląd Bridel'a potwierdziłem, przyrządzając nalewkę według przepisu lekospisu niemieckiego VI, według którego nalewkę przygotowuje się na zimno z prędko i dokładnie wysuszonych korzeni za pomocą rozcieńczonego wysoku w stosunku 1 : 5.

Nalewka przyrządzona w ten sposób z korzeni goryczki trojeściowej prędko i dokładnie wysuszonych, dała wyniki zebrane w tablicy Nr. II.

<sup>20)</sup> Ch. Bégüin. Pharmac. Acta Helvetica 1929 r. Nr. 11 i 12.

<sup>21)</sup> M. Bridel. Application de la methode biochimique à une nouvelle étude de preparatios galeniques de la racine de Gentiane. Lous-Le-Saunier. 1911 r.

T A B L I C A II.

Pochodzenie korzeni	Ciężar gatunkowy przy 15°	Sucha pozostałość w %	Popiołu w %	Gentiopikryna krystaliczna w %	Dane według komentarza dla nalewki z korzenia Goryczki żółtej
Sanok	0,920	7,21	0,11	0,12	ciężar gatunkowy przy 15° 0,917—0,930
Zakopane	0,924	7,89	0,16	0,32	suchej pozostałości 6—8% popiołu — 0,07%

Z przyrządzonej w ten sposób nalewki ze świeżych nie suszonych korzeni nie udało się wcale otrzymać krystalicznej gentiopikryny.

Stosując się do przepisu Bridel'a przyrządziłem nalewkę z suszonego korzenia goryczki trojeściowej, pochodzącej z Zakopanego w następujący sposób:

100 gr. suchego grubo sproszkowanego korzenia wsypałem do 260 gr. wrzącego 90% wysoku i podtrzymywałem wrzenie w przeciągu godziny, następnie odlałem spirytus, a wyciśnięty w prasie korzeń wrzucałem do 260 gr. wrzącego wysoku i znowu podtrzymywałem wrzenie jedną godzinę. Po ostudzeniu wyskok zlałem, korzeń wycisnałem, i obie porcje, po zlaniu razem, przefiltrowałem. W otrzymanej w ten sposób nalewce, w ilości 500 gr. oznaczałem ilość gentiopikryny w zwykły sposób. Ilość gentiopikryny wynosiła 1,55%.

Co do przyrządzania wyciągu gęstego (extr. spissum) z korzenia goryczki to w materiałach do lekospisu polskiego znajdujemy następujący przepis: 1000 gr. sproszkowanego korzenia goryczki oblewa się chłodną wodą (5000 cm.<sup>3</sup>) i odstawia na 24 godziny, od czasu do czasu mieszając, poczem odcedza i pozostałość wyciska w prasie. Na pozostałość nalewa się ponownie 3000 cm.<sup>3</sup> wody i po dwunastu godzinach wyciska jak wyżej. Połączone cedzonki wyparowuje się, najlepiej w próżni, do objętości 3000 cm.<sup>3</sup> i po ochłodzeniu dolewa 1200 cm.<sup>3</sup> spirytusu, miesza i odstawia na trzy dni w chłodne miejsce. Po upływie tego czasu płyn przesącza się, odpędza spirytus, a pozostałość odsta-

wia na dwa dni, poczem znowu przesącza i odparowuje do spójności wyciągu gęstego.

Wyciąg posiada barwę brunatno-czerwonawą, smak bardzo gorzki; w wodzie rozpuszcza się na płyn prawie przezroczysty.

Lekospis niemiecki VI każe nastawiać korzeń na wodzie chloroformowej (1+999) w celu zabezpieczenia od działalności enzymów.

Przyrządzone według tych przepisów ekstrakty z suszonych korzeni dały rezultaty zebrane w tablicy III.

T A B L I C A III.

Pochodzenie surowca	Przygotowanie	Wilgoci w ‰	Popiołu	Kryst. Gentiopikryny w ‰	Rozpuszczalność w wodzie
Zakopane	według materiału do lekospisu polskiego	15,30	3,70	brak	zupełnie
	według lekospisu niemieckiego VI.	18,32	3,18	0 18	lekko-mętna

Bridel w swej pracy, badając ekstrakt przygotowany według lekospisu francuskiego z 1908 r., nie znajdował także gentiopikryny, która uległa hydrolizie. Natomiast wyciąg otrzymany przez wytrawianie (ługowanie — lixiviation) zawierał do 8% gentiopikryny.

## W N I O S K I.

Wartość lecznicza korzeni goryczki żółtej, zależną jest niewątpliwie i to zapewne w znacznej mierze od obecności glukozydu gentiopikryny.

Ilościowe oznaczenia gentiopikryny wykazały, że ilość tego glukozydu w radix gentianae asclepiadeae nie jest mniejszą od ilości tegoż glukozydu w radix gentianae luteae, a nawet nieco wyższą. Wobec tego wydaje mi się rzeczą zupełnie możliwą zastąpienie korzeniem goryczki trojeściowej, rosnącej w Polsce,



sprowadzanego dotychczas z zagranicy korzenia goryczki żółtej.

Za pomocą wrzącego wysoku z korzeni goryczki trojeściowej można otrzymać nalewkę, zawierającą dość znaczne ilości gentiopikryny.

Przy sporządzaniu zaś wyciągu gęstego z goryczki zamiast wody destylowanej lepiej jest używać wody chloroformowej.

Obecnością włókien różni się korzeń goryczki trojeściowej od korzeni goryczki żółtej.

Proszek do celów leczniczych winien być przyrządzany li tylko z korzeni goryczki trojeściowej, a nie z kłaczy, które zawierają tych włókien bardzo wiele.

### R é s u m é.

La vertu thérapeutique des racines de gentiane jaune dépend indubitablement et certainement d'une mesure considérable de la présence du glucoside gentiopicine.

Les résultats des études quantitatives de la gentiopicine ont montré que la quantité de ce glucoside dans la racine de *Gentiana asclepiadea* n'est pas moindre que la quantité de ce glucoside dans la racine de *Gentiana lutea*, mais même un peu plus riche.

Il me semble alors qu'il est possible d'appliquer les racines de *Gentiana asclepiadea* qui croît en Pologne, au lieu des racines de *Gentiana lutea* qu'on a fait venir jusqu'à présent de l'étranger.

Préparant un extrait ferme de gentiane il est mieux de se servir de l'eau chloroformée au lieu de l'eau distillée.

La racine de *Gentiana asclepiadea* se distingue de la racine de *Gentiana lutea* par la présence des fibres.

Le poudre pour l'emploi médicinale doit être préparé seulement des racines de *Gentiana asclepiadea* et pas des rhizomes qui contient une grande quantité de ces fibres.

---

---

Z ZAKŁADU FARMAKOGNOZJI UNIWERSYTETU POZNAŃSKIEGO.

---

Kierownik Zakładu prof. STANISŁAW BIERNACKI.

---

WITOLD GOWOROWSKI.

### **Przyczynek do znajomości glukozydów z liści *Arctostaphylos uva ursi* L. pochodzenia polskiego.**

W zeszytach Nr. 8 z r. 1926 i Nr. 9 z r. 1927 „Pharmaceutica Acta Helvetiae” podaje L. Rosenthaler wyniki swych badań nad glukozydami znajdującymi się w liściach *Arctostaphylos uva ursi* Spreng, mącznica lekarska, pochodzących z rozmaitych krajów Europy a między innymi również i z Polski, ujawniając przy tem pewne istotne różnice odnoszące się do glukozydów otrzymanych z liści rozmaitego pochodzenia. Różnice te zauważyli również uprzednio i inni autorowie, choć badania swoje przeprowadzali na mniej różnorodnym materiale. Rosenthaler znalazł mianowicie, że w liściach mącznicy pochodzącej ze Szwajcarji oraz z Tyrolu znajduje się obok czystej arbutyny również i ester metylowy, metyloarbutyna, w ilości około 25% otrzymanych glukozydów, dalej, że liście mącznicy pochodzące z Hiszpanji dają arbutynę więcej czystą, bo z domieszką tylko około 5% metyloarbutyny. W liściach natomiast pochodzących ze Skandynawji, Finlandji i Polski nie znaleziono wcale metyloarbutyny. Zastanawiając się nad przyczynami, dla jakich w jednym wypadku w tej samej roślinie, zebranej z różnych okolic, zachodzi częściowe metylowanie znajdujących się w niej glukozydów, w innym znów właściwy glukozyd pozostaje niezmieniony — uważam, że rozwiązanie tego zagadnienia mogłoby nastąpić tylko po dłuższych doświadczeniach i badaniach, opartych na jaknajbardziej różnorodnym materiale, zebranych

z różnych miejsc. Być może, że odgrywają tu rolę odmienne warunki klimatyczne, względnie przypuścić należy, że istnieją dla *Arbutus uva ursi* różne rasy biochemiczne.

Narazie pragnąc choć częściowo zbliżyć się do wyjaśnienia tej sprawy, należałoby zbadać dokładniej liście Mącznicy lekarskiej, pochodzące z kraju i stwierdzić, czy rezultaty otrzymane przez Rosenthalera dotyczą jednakowo tej rośliny niezależnie od miejsca w Polsce, skąd ona pochodzi. Rosenthaler nie nadmienia niestety w swojej pracy z jakiej okolicy Polski miał liście, względnie kto mu je dostarczył. Jeśli się jednak weźmie pod uwagę, że autor mógł mieć do swojego rozporządzenia tylko jedną próbę surowca pochodzącego z jakiejś jednej miejscowości w Polsce, to mając na względzie z jednej strony znaczną rozciągłość geograficzną naszego kraju i różnorodną jego strukturę geofizyczną, z drugiej zaś strony odmienne wyniki badań, jakie otrzymano względem tej samej rośliny pochodzącej z innych krajów europejskich, nasuwa się mimowoli przypuszczenie że wspomniane badania mogłyby doprowadzić autora do innego wniosku, gdyby uwzględniono conajmniej kilka prób surowca z rozmaitych stron naszego kraju pochodzącego.

Staraniem Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Poznańskiego, gdzie są przeprowadzane wielostronne badania nad glukozydami i opracowywane metody ich otrzymywania i oczyszczania, sprowadzone zostały liście Mącznicy z kilku miejscowości w Polsce; Kierownik Zakładu powierzył mi wydzielenie z nadesłanych liści właściwych glukozydów oraz ich chemiczne rozpoznanie. Przy wydzieleniu glukozydów posługiwałem się ogólnie przyjętą metodą podaną również we wspomnianej pracy Rosenthalera, którą zresztą w danym wypadku wypadło w toku pracy nieco zmienić.

1 kg. dokładnie wysuszonych i oczyszczonych liści tegorocznego zbioru, sproszkowanych na młynku, gotowałem w ciągu jednej godziny z 4 litrami wody destylowanej, uprzednio zadanej kilkoma gramami  $\text{CaCO}_3$  i odwar ten pozostawiałem do następnego dnia. Po odsączeniu i wyciśnięciu pod prasą zlewałem płyn a pozostałość powtórnie gotowałem z tą samą ilością wody. Następnie płyn przecedzony dolewałem do poprzednio otrzymanego i całość zadawałem roztworem zasadowego octanu ołowiu silnie przytem wstrząsając, tak długo, aż wzięta prób-



ka nie dawała więcej osadu po dodaniu nowej porcji octanu ołowiu. Osad oddzielałem a płyn traktowałem siarkowodorem dla usunięcia wziętej w pewnym nadmiarze soli ołowiu tak długo, aż wzięta próbka badanego płynu nie dawała więcej zmętnienia od siarkowodoru. Dalej odsączałem płyn od czarnego siarczku ołowiu, zagęszczałem w aparacie próżniowym do konsystencji syropu, raz jeszcze filtrowałem i odstawiałem płyn do wykryształizowania, które mi we wszystkich wypadkach przebiegało dość łatwo i dobrze. Otrzymaną masę krystaliczną oddzielałem od ługu pokrystalicznego na kolbie próżniowej, przepłukując ostrożnie wodą. W ten sposób po parokrotnem przekryształizowaniu z wody i ponownem rozpuszczeniu, otrzymałem białe, czyste kryształy w postaci igiełek, będące właściwym glukozidem. Rosenthaler w swojej pracy, na której się wzorowałem podaje, iż powtórna kryształizacja celem oczyszczenia glukozydów przeprowadza się z eteru octowego, ja jednak stosowałem jako rozpuszczalnika również wodę. Okazało się, że rozpuszczalność arbutyny w eterze octowym jest nieznaczna, przez co rozpuszczalnika tego użyć należy stosunkowo dużo. Produkt otrzymany przy przekryształizowaniu z wody, jakkolwiek w równej mierze biały i czysty, daje wyniki ostateczne mniej dokładne od produktu, przekryształizowanego z eteru octowego, co w pracy niniejszej zostało uwzględnionem.

Jak już wspomniano, badane liście pochodziły z różnych stron kraju. Każdorazowo wychodziłem z jednej i tej samej ilości surowca, brałem mianowicie 1 kg. Pierwszą partję liści dostarczono z okolic Włocławka, gdzie roślina ta występuje na dużych przestrzeniach masowo w pobliskich lasach sosnowych. Druga partja pochodziła z województwa Poleskiego z okolic Prużan. Trzecią otrzymano z wileńszczyzny od firmy „Zioła Lecznicze” w Święcianach, liście te były zebrane w najbliższej okolicy tego miasta. Czwartą i ostatnią próbą miały być liście zbierane na Podkarpaciu. Tu jednak spotkał nas zawód, gdyż zamiast umówionych liści Mącznicy lekarskiej, przysłano liście borówki. Wprawdzie z innego miejsca we wschodniej Małopolsce obiecano dostarczyć właściwego surowca, lecz dopiero po kilku tygodniach; wówczas surowiec ten będzie zbadany i wyniki badań dołączone do niniejszej pracy.

Co się dotyczy już zbadanych prób nadmienić trzeba, że ilości otrzymanych glukozydów w każdym z trzech wypadków wypadły różne, pomimo że metoda otrzymywania była ta sama. Również niejednakowa była zawartość ciał żywicowatych i wolnego hydrochinonu, skutkiem czego oczyszczanie produktu w jednym wypadku przebiegało łatwiej w innym znowu trudniej.

W ten sposób z 1 kg. liści pochodzących

z pod Włocławka	otrzymano	. . .	18	gr. arbutyny
" " Prużan	"	. . .	21	" "
" okolic Świącian	"	. . .	28,5	" "

Jak widzimy w ostatnim wypadku wydajność wypadła największa (2,85%), również otrzymywanie i oczyszczanie przebiegało łatwiej, niż poprzednio, gdyż ilość ciał zanieczyszczających była o wiele mniejsza.

W podany powyżej sposób oczyszczona i ostatecznie przekrystalizowana z eteru octowego i wysuszona nad chlorkiem wapnia w ciemnym eksikatorze arbutyna w postaci białych błyszczących igiełek posiadała punkt topliwości 198° dawała następujące reakcje:

- 1) Roztwór arbutyny od 2 — 3 kropli  $\text{FeCl}_3$  zabarwia się na kolor niebieski.
- 2) Kwas azotowy jak rozcieńczony tak i stężony rozpuszczał otrzymaną arbutynę z zabarwieniem żółto-pomarańczowym.
- 3) 5  $\text{cm}^3$  roztworu wodnego arbutyny, zadane 5—7 kroplami odczynnika Jungmana (1gr. fosfomolibdenianu sodowego, 10  $\text{cm}^3$  stężonego  $\text{HCl}$  i 20  $\text{cm}^3$  wody) i zmieszane z równą ilością amoniaku daje zabarwienie błękitne.

Według Goris'a metyloarbutyna nie daje zabarwienia, ani z roztworem  $\text{FeCl}_3$  ani z odczynnikiem Jungmana.

Analiza elementarna wykazała następującą zawartość procentową C, H, w wysuszonej do 120° arbutynie.

- 1) 0,1952 gr. substancji dało 0,3759 gr.  $\text{CO}_2$  i 0,1073 gr.  $\text{H}_2\text{O}$ .
- 2) 0,1668 " " " 0,3214 " " " 0,0898 " "

Stwierdzono 1) C = 52,52% i H = 6,15%

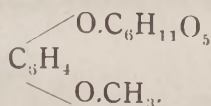
2) C = 52,58% i H = 6,02%.

Arbutyna wymaga: C = 52,94% i H = 5,88%.

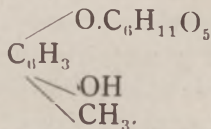
Ponieważ badana substancja nie zawierała azotu i innych pierwiastków, wobec tego przypada na tlen (z różnicy średnio) 41,34.

W dalszym ciągu pracy otrzymaną arbutynę poddałem badaniu na zawartość metyloarbutyny według metody Zeisel'a, która jest jednocześnie jakościową i ilościową metodą; oznacza się mianowicie obecność w badanym związku grup  $\text{OCH}_3$  (metoksyłowych) lub  $\text{OC}_2\text{H}_5$  (etoksyłowych) i procentową zawartość odpowiedniego związku oksyalkilowego.

Nadmienić tu wypada, że wzór chemiczny dla metyloarbutyny nie u wszystkich autorów jest uzgodniony; ponieważ jednak wspomniana metoda Zeisel'a odnosi się wyłącznie tylko do grup  $\text{CH}_3$  lub  $\text{C}_2\text{H}_5$ , które są związane z rdzeniem benzolowym hydrochinonu za pośrednictwem atomu tlenu (wiązanie eterowe), nie daje zaś żadnych wyników jeśli grupa  $\text{CH}_3$  lub  $\text{C}_2\text{H}_5$  jest związana bezpośrednio z węglem rdzenia benzolowego, wówczas bowiem nie następuje odszczepienie grup alkilowych, zatem przyjąć należy wzór eterowy, tembardziej, że metoda ta była uprzednio niejednokrotnie stosowana do badań nad arbutyną. Wzór ten podaje również Beilstein:



Nieodpowiedni byłby natomiast w tym wypadku wzór metylowy, z którym się spotykałem u innych autorów (Van Rijn Die glucoside):

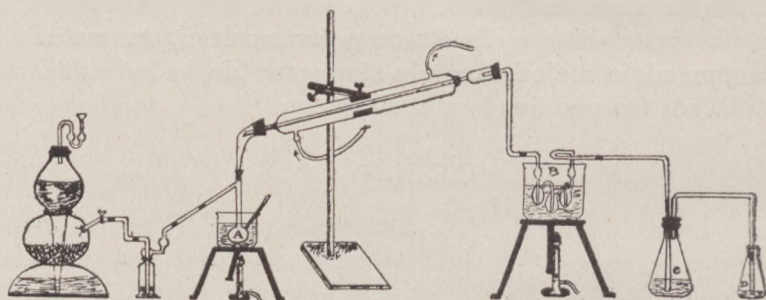


Albo też chcąc uzgodnić obydwie spotykane wzory, przyjąćby należało, że związek ten występuje w dwóch postaciach tautomerycznych, raz jako związek metylowy, drugi raz jako metoksyłowy, wówczas jednak wypadłoby wyświetlić w jakich wypadkach i według którego wzoru dany związek reaguje.



## PRZEBIEG OZNACZANIA.

Do kolbki destylacyjnej A, pojemności okło  $35\text{ cm}^3$  wsypujemy odważoną i dokładnie wysuszoną arbutynę w ilości okło 0,2 gr. Boczną rurkę kolbki łączymy z aparatem Kippa, służącym do wywiązywania  $\text{CO}_2$ , wlewamy do kolbki  $10\text{ cm}^3$  kwasu jodowodorowego c. g. 1,7, p. w.  $127^\circ$  i łączymy szyjkę kolbki z chłodnicą, przez którą przez cały czas doświadczenia przepuszczamy wodę o temp.  $40^\circ\text{--}50^\circ$ . Kolbka destylacyjna jest połączona do gliceryny, którą się ogrzewa do temp. wrzenia jodowodoru. Z drugiej strony chłodnica, jak widzimy na rysunku, jest połączona z Kali-aparatem Geisslera, którego kulki napętlone są wodną zawiesiną z 0,5 gr. czerwonego fosforu; w aparacie tym są pochłaniane pary wolnego jodu i jodowodoru powstające przez wytwarzający się w kolbce destylacyjnej jodek



metylu. Wolny natomiast jodek metylu przechodzi dalej i wstępuje do kolbki C z alkoholowym roztworem  $\text{AgNO}_3$  i dalej do drugiej takiej samej kolbki z mniejszą ilością wspomnianego roztworu. W pierwszej kolbce a częściowo i drugiej, o ile badany związek zawiera grupy metoksyłowe wytwarza się osad  $\text{AgJ}$ , z ilości którego obliczamy następnie ilość procentową metyloarbutyny. Kali-aparat z zawiesiną fosforu jest zanurzony w wodzie ogrzewanej przez cały czas doświadczenia do temp.  $50^\circ\text{--}60^\circ$ .

Każda z trzech kolejno przeprowadzonych prób dała mi wynik negatywny. W ten sposób przekonałem się, że we wszystkich trzech wypadkach miałem do czynienia z czystą ar-

butyną bez śladów metylo-arbutyny. Wynik ten w zupełności potwierdza rezultat otrzymany przez Rosenthalera, że liście *Arbutus uva ursi* polskiego pochodzenia nie zawierają metylo-arbutyny.

Jak już wspomniałem, dla sprawdzenia badałem również punkty topliwości otrzymanego produktu i we wszystkich trzech wypadkach wypadły mi zgodnie, mianowicie, właściwy drugi punkt topliwości w temperaturze  $199^{\circ}$ — $200^{\circ}$ , podczas gdy pierwszy punkt topnienia, niezbyt zresztą wyraźnie zachodzącego — przy  $163^{\circ}$ — $164^{\circ}$ .

Cząsteczka arbutyny krystalizuje z jedną cząsteczką wody krystalizacyjnej według jednych autorów, lub też z pół cząsteczki wody według innych, i ten pierwszy punkt topnienia jest to topnienie we własnej wodzie krystalizacyjnej. Mając już ukończone wyniki badań co do arbutyny z krajowego surowca, zbadałem dodatkowo arbutynę Mercka, jaką Zakład tutejszy posiada w swoich zbiorach. Tu otrzymałem nieznaczne zmętnienie roztworu  $\text{AgNO}_3$ , z ilości osadu  $\text{AgJ}$  można było wnioskować, że preparat ten zawiera ślady metyloarbutyny, jego punkt topliwości wynosi  $193^{\circ}$ , co również jest potwierdzeniem obecności wspomnianej domieszki. Metoda badania Zeisel'a, którą się posługiwałem, daje rezultaty dokładne, gdyż procent błędu może wynosić najwyżej 0,5.

### W n i o s k i.

Badania moje nad liśćmi mącznicy, pochodzącymi z trzech różnych, dość oddalonych od siebie miejscowości Polski, potwierdziły w zupełności badania Rosenthalera co do braku metylowanych pochodnych arbutyny w tych liściach. Ten brak metylowanych pochodnych arbutyny sprawia, że liście naszej mącznicy są pierwszorzędym materiałem do otrzymywania zupełnie czystej arbutyny.

Przy zastosowaniu jednakowej metody wydzielania arbutyny z liści, otrzymałem największą ilość arbutyny z liści pochodzących z okolicy Święcian, a więc z najbardziej na północ położonej części Polski.

## R é s u m é.

Les résultats de mes études sur les feuilles de Busserole (raisin d'ours) provenant de trois différents et assez éloignés endroits de la Pologne, ont entièrement confirmé les recherches de Rosenthaler en ce qui concerne le manque de dérivés de l'arbutine dans ces feuilles.

Ce manque de dérivés méthylés de l'arbutine fait, que les feuilles de notre raisin d'ours sont une excellente matière première pour obtenir l'arbutine absolument pure.

En appliquant toujours la même méthode de la préparation de l'arbutine de ces feuilles, j'ai reçu la plus grande quantité de l'arbutine de feuilles provenant de Świąciany, de cette partie de la Pologne alors, située le plus au nord.

---

---



Z ZAKŁADU FARMAKOGNOZJI I BOTANIKI LEKARSKIEJ  
UNIwersytetu warszawskiego).

Kierownik Zakładu prof. Dr. WŁ. MAZURKIEWICZ.

F. W. KUDRZYCKA.

**Mikrochemja ziaren skrobi i amyloplastów  
w bulwach ziemniaka — *Solanum tuberosum*.**

**W S T Ę P.**

Oddawna już zajmowano się sprawą wyjaśnienia składu chemicznego skrobi i sposobu powstawania jej w amyloplastach.

Stwierdzono, że skrobia handlowa czyli krochmal „*amylum*” składa się nietylko z węglowodanów, lecz zawiera substancje nieorganiczne, jak potas, wapń, magnez, krzemionkę, stanowiące popiół, tudzież substancje organiczne, w skład których wchodzi azot, fosfor, a również olej i fitosteryna, przyczem azot stanowi składnik białka.

Badając ziarna skrobi, wyróżniono dwa rodzaje polisacharydów: amylozę i amylopektynę (określenia obecnie powszechnie przyjęte), które stanowią główną masę ziarna i małe ilości kationów, i anionów wyżej wymienionych. Metody, które doprowadziły do tych wyników, były: mikroskopowe, chemiczne i fizykochemiczne. Obecność substancji mineralnych została stwierdzona tylko drogą makrochemiczną i fizykochemiczną: przy pomocy elektrodializy oddzielono amylopektynę od amylozy i oznaczono ilościowo zawartość anionów. Amylopektyna i amyloza były przedmiotem badań chemii koloidów i w bardzo małym zakresie mikrochemji, np. klajstrowanie ziaren skrobi, barwienie jodem, działanie enzymami, nadto zajmowano się sprawą powstawania poliamyloz, również jednak jedynie na drodze makrochemicznej.

Wreszcie badano powstawanie ziaren skrobi w amyloplastach oraz przyczyny, które wywołują uwarstwienie i nadają specjalne własności otoczce ziarna, jednak chemiczna natura amyloplasty, poza kilku reakcjami, jak Millona i ksantoproteinową, wskazującymi na białko, nie została dokładnie poznana.

Dawniejsze badania mikroskopowe (barwienie fuksyną, działanie kw. siarkowego, kilka reakcji na białko), wykazały obecność cienkiej warstwy amyloplasty na powierzchni ziarna, nowsze zaś zaprzeczyły istnieniu specjalnej otoczki białkowej, wskazując na występowanie białka w całej stromie (zrębie) ziarna skrobiowego.

Przedmiotem moich badań są *ziarna skrobi i amyloplasty* w bulwach ziemniaka — *Solanum tuberosum*, celem zaś ich jest wyjaśnienie: p o p i e r w s z e, jakie substancje mineralne i organiczne wchodzi w skład amyloplasty i ziarna skrobi i w jaki sposób są w niem rozmieszczone, p o d r u g i e, czy całkowicie wykształcone ziarno skrobi posiada amyloplast w formie szczątkowej, a jeżeli posiada, to jak jest on rozmieszczony, p o t r z e c i e, jakie czynniki chemiczne i fizyczne powodują rozpad skrobi i jakie związki chemiczne powstają pod wpływem tych czynników.

W badaniach tych posługiwałam się wyłącznie metodą mikrochemiczną. Chcąc uniknąć pomyłek, zajmowałam się badaniem tylko tych amyloplastów, które występowały łącznie z ziarnami skrobi, a więc zawierających wewnątrz ziarno skrobi, albo znajdujących się tuż obok ziarna skrobi; stosunek amyloplastów do mikrosomów i mitochondrjów nie wchodził w zakres moich badań.

P a n u P r o f. D r. W ł a d y s ł a w o w i M a z u r k i e w i c z o w i składam gorące podziękowanie za udzielanie mi cennych rad i wskazówek w czasie wykonania niniejszej pracy, oraz za troskliwe zainteresowanie się jej postępami.

Poczuwam się również do miłego obowiązku złożenia podziękowania P a n u P r o f. D r. R o m a n o w i N i t s c h o w i za pozwolenie korzystania z lampy kwarcowej w Zakładzie Higjeny, a także P a n u M a g. J ó z e f o w i S o b c z a k o w i, asystentowi tegoż Zakładu, za okazaną pomoc przy nastawianiu lampy.

## I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.

### A. Streszczenie poglądów na skład chemiczny i budowę skrobi.

#### 1. Składniki chemiczne ziarna.

Bliższe badania ziaren skrobi<sup>1)</sup> doprowadziły do wniosku, że skład chemiczny ziarna skrobi nie jest jednakowy. Metody, jakie służyły do wyróżnienia różnych składników skrobi, były początkowo proste: działanie gorącej wody, enzymów, barwienie jodem. Pierwszy *Leeuwenhoeck*<sup>2)</sup> w roku 1715 spostrzegł, że pod wpływem gorącej wody, a także soków trawiennych przewodu pokarmowego, pozostaje nierozpuszczalna otoczka, uznał więc ją za „nieodżywcza” część ziarna, drugą rozpuszczalną część ziarna nazywa „odżywcza”. *De Saussure* nazwał składnik nierozpuszczalny w wodzie *Ligneux amylacé*, a rozpuszczalny — *amidin*. Późniejsi badacze, jak *Raspail*, *Guerrin-Varry*, *Payen* i *Persoz*<sup>2)</sup>, stwierdzili również nierozpuszczalną część ziarna, oznaczyli procent jej zawartości i badali jej zdolność barwienia się z jodem. Według teorii *C. Nägeli*'ego ('58) ziarno składa się z dwóch substancyj: jedna z nich *granuloza* jest rozpuszczalna w wodzie i podlega działaniu enzymów, druga bardziej oporna, stanowi szkielet ziarna i, ze względu na podobieństwo do celulozy, otrzymała nazwę *amylocelulozy*. Następnie *W. Nägeli* ('74) próbuje wytłumaczyć różnice w oporności składników skrobi różnym stopniem rozdrobnienia jedna-

---

<sup>1)</sup> W języku polskim istniały oddawna dwa terminy: *skrobia* i *rzerzydło* dla oznaczenia *amylum*. Termin *skrobia* wprowadził w użycie *Czerwinski*, zastępując nim powszechnie używaną nazwę *krochmal*, który jest zmienionym wyrazem niemieckim *Kraftmehl*. (Por. *Chałubiński* '49).

<sup>2)</sup> Cytuje *Samiec* ('27), p. 1—2.

kowej substancji skrobiowej. Podobny pogląd wyraził i De Vries ('85). Otrzymaniem otoczek ziaren w postaci woreczków zajął się Pałła din ('83), działając na kleik skrobiowy alkoholem. B r u k n e r ('83) przez roztarcie ziaren między dwoma szkiełkami otrzymał substancję przesączalną, barwiącą się od jodu na niebiesko, zaznaczając, że wewnętrzna błona chroni ziarno od rozpuszczenia.

Następnie M e y e r ('95 p. 4—26), wyróżniając w ziarnie  $\alpha$  i  $\beta$  — amylozę, bada ich własności rozpuszczania się w wodzie, barwienia się z jodem, a także zmianę, jaka zachodzi w skrobi pod wpływem enzymów i kwasu.

Jednak nie wszyscy uczeni mają ten pogląd na budowę skrobi, mianowicie F l ü c k i g e r ('71) i M u s c u l u s ('79) przypuszczają, że amyloceluloza stanowi wtórny produkt, wywołany przez działanie odczynników na skrobię, Meyer jednak utrzymuje, że  $\alpha$  — amyloza znajduje się w ziarnie w postaci krystalicznej, która stawia duży opór przy wnikaniu wrzącej wody i jodu. Stosunek  $\alpha$  — amylozy do  $\beta$  — amylozy przedstawia się w ten sposób, że  $\alpha$  — amyloza występuje w postaci bezwodnych, a  $\beta$  — amyloza uwodnionych kryształów tej samej substancji

S y n i e w s k i ('99) zgodnie z wynikami B r o w n a i H e r o n a ('79) znalazł, że wydajność amylocelulozy zależy od koncentracji kleiku i wyraża przypuszczenie, że amyloceluloza nie występuje w ziarnie, lecz tworzy się z substancji, znajdującej się w kleiku. Pogląd ten popiera wynikiem, jaki otrzymał z kleikiem: zależnie od oziębiania lub ogrzewania, otrzymał on strącającą się lub rozpuszczającą się substancję; substancję rozpuszczającą się przy ogrzewaniu badacz ten utożsamiał z  $\alpha$  — amylozą Meyera.

Według B l o e m e n d a h l a ('09)  $\alpha$  i  $\beta$ -amyloza Meyera jest identyczną z celulozą i granulozą N ä g e l i e g o.

Następnie przychodzą badania M a q u e n n e ' a ('04—'08), R o u x ('05—'06) i G r u ż e w s k i e j ('08—'12). M a q u e n n e stawia teorię zmian wstecznych (*retrogradacji*) dla amylocelulozy: rozpuszczalną część ziarna stanowią amylozy, nierozpuszczalną zaś amylopektyna, która ma być rozmieszczona w całym ziarnie, później zaś, gdy współpracowniczka jego G r u ż e w s k a wydzieliła amylopektynę w postaci woreczków przez działanie ługiem i alkoholem, zmienił swój pogląd, uważając amylopektynę za zewnętrzną część ziarna. Woreczki, otrzymane



z ziaren skrobi (można je nazwać otoczkami), składają się nie z czystej amylopektyny, lecz zawierają i substancje mineralne. Zależnie od metody, a również i od gatunku skrobi otrzymywano różną ilość amylopektyny i amylozy. Tanret ('14—'15) zbadał pod tym względem 16 gatunków skrobi i w każdym znalazł odmienną ilość amylopektyny i amylozy, a więc np. skrobia ziemniaczana zawiera 73% amylopektyny i 27% amylozy, skrobia pszeniczna — 67,5% amylopektyny i 32,5% amylozy, skrobia ryżowa — 68,5% amylopektyny i 31,5% amylozy, skrobia kukurydzy — 70% amylopektyny i 30% amylozy, skrobia żytnia — 78,5% amylopektyny i 21,5% amylozy. Amylopektyna i amyloza były również przedmiotem badań Polaka i Tychowskiego ('29).

Ostatecznie Maquenne wyraża przypuszczenie, że zasadniczo amylopektyna nie różni się od amylozy, albowiem tak pierwsza, jak i druga zawiera prawdopodobnie ten sam podstawowy kompleks węglowodanowy, jedynie o różnym stopniu kondensacji.

Założenie Maquenne'a znalazło potwierdzenie w całym szeregu prac nad budową skrobi: Scharfinger ('04—'11), szkoła Pringsheima ('12—'25), Herzfeld i Klinger ('20), szkoła Karrera ('20—'23) dochodzą do wniosku, że podstawowym kompleksem skrobi jest najprostsza krystaliczna poliamyloza czyli amylodekstryna, która jest pochodną maltozy, przyczem Herzfeld i Klinger sądzą, że jedynie maltozany wchodzą w skład skrobi i stanowią w niej różny stan rozproszenia (dyspersji) i nie są chemicznie związane w jedną cząsteczkę.

Natomiast Pictet ('18—'20) i Sarasin ('18) utrzymują, że pierwotnym składnikiem skrobi jest krystaliczny lewoglukoza, bezwodnik glukozy, związany w cząsteczce skrobi w formie glukozydu, jak to ma miejsce w celulozie, koniferynie, salicynie i apiinie. Badaczom tym udało się nie tylko otrzymać lewoglukoza przez suchą destylację skrobi i celulozy, lecz również zamienić go za pomocą polimeryzacji w dekstrynę, nie identyczną wprawdzie z naturalną amylodekstryną. Badania Pictet'a i Sarasin'a zostały potwierdzone przez Karrera.

Nadto według badań O. v. F r i e d r i c h a ('14—'23) nad produktami depolimeryzacji skrobi, otrzymanymi za pomocą kw. szczawiowego i działaniem na nie emulsyny, w budowie cząsteczki skrobi kolejno uczestniczą dwie stereoisomeryczne *d*-glukozy: połączenie  $\alpha$ -glukozydu odpowiada *maltozie*, połączenie zaś  $\beta$ -glukozydu odpowiada *izomaltozie*.

Wreszcie badania K u h n a ('24) nad produktami zczukrzenia amylozy skrobi ziemniaczanej za pomocą emulsyny gorzkich i słodkich migdałów również przemawiają za glukozydowym połączeniem cukrów w cząsteczce skrobi.

Oprócz węglowodanów wchodzących w skład amylopektyny i amylozy, ziarna skrobi zawierają jeszcze inne składniki. M e y e r ('95 p. 12) podaje, że amyloza zawiera 1% popiołu, a R o u x wykrył w popiele kwas krzemowy. G r u ż e w s k a objaśnia oporność ziaren na działanie diastazy właśnie występowaniem substancji mineralnych, wykrytych w popiele. S a m e c ('14), stosując nową metodę — *elektrodializę*, spostrzegł, że kwas krzemowy występuje w amylopektynie, a M a l f i t a n o i C a t o i r e ('22), badając rozprzestrzenienie kw. krzemowego w ziarnie skrobi, znaleźli w amylocelulozie różną zawartość  $\text{SiO}_2$ ; przypuszczają oni, że kw. krzemowy występuje w związku z polisacharydem, tworząc kompleks o typie:  $[\text{SiO}_3(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n]\text{H}_2$ , natomiast S a m e c powątpiewa o istnieniu takiego związku. Co się zaś tyczy fosforu, to F e r n b a c h ('04) znalazł, że małe ziarna skrobi zawierają więcej fosforu, niż duże. M a l f i t a n o ('06) podaje przypuszczalny wzór połączenia fosforu ze skrobią typu  $[\text{PO}_4(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n]$ , łączącego się z katjonami. Również T h o m a s ('14) i K e r b ('19) sądzą, że skrobia stanowi ciało zawierające fosfor. S a m e c ('27 p. 14) stawia teorię o kwasie amylofosforowym<sup>1)</sup>, popartą badaniem N o r t h r o p a i N e l s o n a ('16), że fosfor nie występuje w białku. S a m e c zajął się sprawą rozmieszczenia azotu, fosforu i krzemu w ziarnie skrobi. Początkowo badał on z Z o r k ą A n t o n o v i c ('27) skrobię naświetlaną, później kleik ze

<sup>1)</sup> Ponieważ nie znalazłam w polskiej literaturze chemicznej odpowiedniego terminu dla „Amylophosphorsäure“, wobec tego tłumaczę dosłownie na „Kwas amylofosforowy“, zastrzegając się, że nie mam zamiaru stwarzać specjalnego terminu i że związek ten nie ma nic wspólnego z alkoholem amylowym.

skrobi naturalnej ('28) i znalazł, że *substancja wewnętrzna* nie zawiera N,Si, a ślady P, *stroma* natomiast wewnętrznej i zewnętrznej części ziarna zawiera N,P i Si (ten ostatni w równych ilościach), fosforu zaś jest więcej w stromie wewnętrznej, a azotu w zewnętrznej części ziarna. Amyloza więc nie zawiera azotu i fosforu.

Badając dalej połączenie krzemu, stwierdzili M a l t i f a n o i C a t o i r e ('28), że pogląd S a m e c a, jakoby skrobia była kondensatem cząsteczek, w którym fosfor jest związany w postaci estru, a kw. krzemowy i katjony są domieszkami, jest niesłuszny. Opierając się na wynikach swych badań, sądzą oni, że *micelle*, tworzące ziarno skrobi, składają się z cząsteczek, zgrupowanych w bardzo złożone kompleksy typu W e r n e r a. Kw. fosforowy i krzemowy tworzą kompleks z grupą węglowodanową i ten złożony anjon łączy się z katjonami. Amyloza jest polymerem cząsteczek heksozanu  $C_6H_{10}O_5$  i wolną od mineralnych składników, amyloceluloza stanowi kompleks amylozy z krzemianami, a amylopektyna jest połączeniem amylozy z fosforanami.

Oprócz wymienionych anjonów, w skrobi występują katjony, a więc potas, wapń, magnez.

Z w i k k e r ('21) przypisuje amylopektynie specjalne właściwości właśnie ze względu na występowanie w niej połączenia kw. amylofosforowego z katjonami, przytem podaje, że w skrobi ziemniaczanej występuje potas, brakuje natomiast zupełnie wapnia. Badania nad połączeniem węglowodanów z katjonami i anjonami są w toku i rozmieszczenie ich w skrobi nie jest jeszcze ustalone.

Skrobia handlowa, oprócz wody, posiada substancję zawierającą azot, rozpuszczalne węglowodany, olej, fitosterynę (W i e s n e r '28), a także i składniki mineralne, których wykaz % podaje K ö n i g ('08).

## 2. B u d o w a z i a r n a s k r o b i.

N ä g e l i ('82) uważa, że cząsteczki skrobi zgrupowane są w *molaty (micelle)*, które posiadają budowę krystaliczną. Także i S c h i m p e r ('81) i M e y e r ('95 p. 110—120) przypisują skrobi budowę sferokryształu. Według M e y e r a sferokryształ skrobi składa się z promieniowo ułożonych igiełkowatych two-



rów krystalicznych, które nazywa *trichitami*. Trichity są rozgałęzione i połączone w pęczki odchodzące od środka. Budowę trichitową można zaobserwować wtedy, skoro część ziarna ulegnie rozpuszczeniu, np. przez działanie gorącej wody, rozcieńczonych kwasów, roztworu diastazy.

B ü t s c h l i ('96) przypisuje skrobi budowę komórkową (*Wabenstruktur*): koncentryczne warstwy są przecięte promieniami smugami.

C z a p e k ('03) nie widzi jednak w optycznych własnościach ziaren skrobi dowodu budowy krystalicznej ponieważ żel, w którym stosunki napięciowe są nierównomiernie rozłożone, również daje podobny obraz.

Budowa krystaliczna została potwierdzona przez badanie rentgenograficzne, jednakże S p o n s l e r ('20), chociaż ozna-  
czył odległość cząsteczek i ich wielkość, uważa, że ziarno skrobi nie jest bezpostaciowe, lecz również nie może być uważane za kryształ w ścisłym tego słowa znaczeniu.

*Występowanie uwarstwienia* na ziarnie skrobi objaśniano w różny sposób:

F r i t s c h e ('34) uważa, że uwarstwienie spowodowane jest różną gęstością warstw, M ü n t h e r ('45) tłumaczy dośrodkowym nakładaniem substancji skrobiowej, N ä g e l i ('58) i Z i m m e r m a n n ('90) widzą w tem różną zawartość wody, a M e y e r ('95 p. 105) wyjaśnia to ułożeniem trichitów w gęstym płynie.

Sposób, w jaki powstaje uwarstwienie na ziarnie skrobi, różnie jest tłumaczony.

M e y e r ('95 p. 242) objaśnia wahaniem, jakie występują w ługu macierzystym, gdzie powstaje ziarno: w dzień, w czasie asymilacji, chromatofor tworzy gęste warstwy, w nocy, gdy cukru mało, rzadkie; K ü s t e r ('14) uzależnia formowanie się uwarstwienia od dopływu cukru i jego zużycia; K r a e m e r ('02) zaś od koloidalnego roztworu amylozy. Z w i k k e r ('21 p. 35, 41, 79), badając skrobię ziemniaczaną uważa, że tworzenie się warstw jest wynikiem zjawisk czysto fizycznych, przytem spostrzegł zależność między ilością amylopektyny a występowaniem uwarstwienia: ziemniak według niego, wbrew badaniom T a n r e t ' a ('14), zawiera dwa razy tyle amylopektyny, co pszenica,



uwarstwienie w pierwszym wypadku jest dobrze widoczne, gdy w drugim nie. Następnie bierze pod uwagę skład chemiczny skrobi i okazuje się, że uwarstwienie ziaren skrobi różnych gatunków roślin zależy od różnych katjonów, które są połączone z kw. amylofosforowym. W ziarnie skrobi ziemniaka występuje katjon potasu, dlatego też uwarstwienie jest wyraźne i opór na działanie fermentów diastatycznych duży, w ziarnie pszenicy zaś, gdzie przeważa katjon wapnia, uwarstwienie jest niewidoczne i opór na działanie fermentów mały. Według tego poglądu, obecność amylofosforanu wapniowego wpływa na micelle, które wykazują małą zdolność do formowania warstw, podczas gdy amylofosforan potasu łatwo aglutynuje się i tworzy trudno rozpuszczalne warstwy.

Gdy *plastyda* po wydzieleniu pewnej ilości substancji zawiera swą funkcję, utworzona nowa powierzchnia na ziarnie zostaje w spokoju przez pewien czas. W okresie beczynności *plastydy*, siły cząsteczkowe wykonują swą czynność akumulacji subetncji bardziej czynnej pod względem napięcia powierzchniowego, a więc soli potasowej kw. amylofosforowego.

Z w i k k e r skłania się do przyjęcia poglądu, że ziarna skrobi powstają przez nakładanie — *appositio*.

Zjawisko aglutynacji powtarzałoby się więc za każdym razem, gdy nowoutworzona powierzchnia zewnętrzna przez pewien czas pozostaje w spokoju.

S a m e c ('27 p. 92) patrzy na tę sprawę ze stanowiska chemii koloidów, sądząc, że warstwy tworzą się tak, jak pierścienie L i e s e g a n g a, bez zewnętrznych bodźców wzrostu, dzięki rytmowi wewnętrznemu, co już wyraził i M e y e r ('95 p. 115) w swym poglądzie na powstawanie ziaren skrobi, a również i J e n t y s ('07).

J e n t y s otrzymał sztuczne obrazy ziaren, wywołane przez zastyganie roztworu granulozy z taniną. Według niego jest to typowe krzepnięcie roztworu koloidalnego.

### *Zewnętrzna powłoka ziarna skrobi.*

Spostrzeżono, że zewnętrzna część ziarna zachowuje się inaczej, niż wewnętrzna, zajęto się więc badaniem, jaka jest zewnętrzna otoczka ziarna skrobi. Nadawano jej znaczenie ochronne dla całego ziarna ze względu na oporność, jaką wykazuje

i czem różni się od pozostałej części ziarna. C. Nägeli<sup>1)</sup> uważa, że obwodowa warstwa ziarna bogatsza jest w amylocelulozę, a uboższa w wodę. Że istotnie występują różnice chemiczne w obu warstwach, dowodem tego jest odmienne zachowanie się ich względem jodu: jod nie barwi zewnętrznej warstwy, podczas gdy wewnętrzna część ziarna zostaje zabarwiona.

Beyerink ('12) podaje, że odmienna natura zewnętrznej błony polega na obecności ciał białkowych. On pierwszy uwzględnił występowanie azotu jako nierozdzielonego składnika ziarna skrobi. Inkrustowanie skrobi białkiem leukoplastu nadaje jego zdaniem, specjalny charakter fizyczny otoczce ziarna. Nie był jednak w stanie wykazać różnicy w ilości azotu całego ziarna, a otoczkami otrzymanymi z kleiku, by udowodnić swoje założenie, Zwickler ('21) rozpatrując hipotezę Beyerinka stawia pytanie, dlaczego w czasie wzrostu ziarna białko ma być stale na obwodzie? Beyerink próbował reakcjami barwnymi wykazać możliwą lokalizację białka pod mikroskopem, lecz próby te nie dały rezultatu. Zwickler (p. 76) przerabia 3 reakcje na białko: *Krassera*, która wypada ujemnie, z *ninhydriną* otrzymuje zielone zabarwienie bez umiejscowienia, z *Millonem* słabe różowe zabarwienie. Dwie reakcje ostatnie nie przyczyniają się do wyjaśnienia sprawy, autor bowiem nie jest w stanie ustalić, czy zabarwienie występuje równomiernie w całym ziarnie. Następnie nie uznaje otoczki zewnętrznej, uważając, że azot jest równomiernie rozmieszczony w całym ziarnie, oraz przeciwstawia się pogładowi Jentysa ('07), który podaje, że na powierzchni ziarna występują garbniki.

Za istnieniem specjalnej odpornej otoczki dokoła ziarna przemawia i Reichert ('13), lecz Zwickler sądzi, że pogląd ten nie wytrzymuje krytyki: każda warstwa zewnętrzna staje się zczasem wewnętrzną, a więc białko musi być wewnątrz. Powstająca bowiem przy klajstrowaniu powłoka jest zlaniami błon amylopektynowych, między którymi znikła amyloza. Hipoteza Beyerincka i Jentysa, zdaniem Zwickera, powinna być odrzucona.

Binz ('92) badał stosunek między chloroplastem i ziarnem skrobi. Działając stęż. kwasem siarkowym na ziarna skrobi,

<sup>1)</sup> Podaje Samec ('27) p. 92.

znajdujące się w chloroplastach w roztworze cukru, spostrzegł on, że skrobia rozpuszcza się i pozostaje chloroplast, który zachowuje swój kształt pierwotny. Ziarna skrobi, mające chloroplast w formie czapeczki zielonej na jednym końcu, zachowują się względem kwasu tak samo: ziarno skrobi rozpuszcza się, a pozostaje amyloplast, składający się z zielonej części i bezbarwnej części odchodzącej od niej, a utrzymującej kształt ziarna. Stąd autor ten wyprowadza wniosek, że ziarno skrobi jest powleczone dokoła cienką warstwą chloroplastu.

Meyer ('95 p. 163, 167) podziela pogląd Binza, sądząc, że ziarno skrobi w żywej komórce zawsze i całkowicie powleczone jest chloroplastem, leukoplastem lub chromoplastem, które wykazał, barwiąc fuksyną.

Zwikkera uważa również, że leukoplast otacza ziarno dokoła i stanowi delikatną powłokę, która jednak przy uszkodzeniu komórki, gdy skrobia jest wymywana wodą, zostaje zniszczona. Związek między leukoplastem i skrobią jest nadzwyczaj słaby.

Samiec ('27 p. 94) popiera pogląd Zwikkera, podając rezultat swych badań i Zorki Antonowicz nad rozprzestrzenieniem azotu w stromie ziarna, co zgadza się z poglądem na występowanie białka we wnętrzu ziarna, zaznacza jednak, że ostateczny wynik będzie zależeć od badań chemji kolidów.

## **B. Streszczenie poglądów na budowę amyloplastów i ich funkcję.**

Amyloplasty występują w częściach rośliny, niezawierających chlorofilu. Zostały one po raz pierwszy zaobserwowane przez Schimpera ('80), który badał powstawanie skrobi. Autor ten spostrzegł, że ziarna skrobi wytwarzają się nie w plazmie, lecz w specjalnych, silniej załamujących światło ciałkach, kształtu okrągłego lub wrzecionowego, przyczem ziarna skrobiowe znajdują się wewnątrz tych ciałek lub są przyczępione do nich. Ciałka te są w wysokim stopniu nietrwałe i skoro płyn, otaczający komórkę przeniknie do wewnątrz, silnie pęcznieją i rozpuszczają się. *Roztwór jodu* zabarwia je na żółto, *odczynnik Millona* na ceglasto-czerwono, *kwas azotowy*



na żółto. Reakcje te wskazują, że ciała te składają się z substancji białkowej. Twory te poprzedzają pojawienie się ziaren skrobiowych i w podobny sposób, jak chloroplasty, początkowo gdy poczną wytwarzać się w nich skrobia, powiększają się, tracąc przytem zdolność załamывania światła, później zaś zmniejszają się i wreszcie znikają. Ciała te nazwał Schimper „*Stärkebildner*“, co odpowiada polskiej nazwie „*Skrobiarki*“, terminowi utworzonemu przez Raciborskiego ('94). Schimperoskie „*Stärkebildner*“ są identyczne z wykrytymi przez Nägeli'ego „*Bläschen*“. Amyloplasty mogą w większości wypadków pod wpływem światła zamienić się na chloroplasty; dochodzi wtedy do wytworzenia, jak nazywa Schimper, fałszywych chloroplastów, które są znane np. u *ziemniaka*.

W ziemniaku w komórkach kory, w sąsiedztwie korka znajdują się, według Wiesnera ('77), *ciałka etjolinowe*, które pod wpływem światła, zamieniają się na chloroplasty. Według Schimpera są to opisane przez niego *amyloplasty*. W głębszych zaś pokładach tkanki, gdzie ziarna skrobi są większe, amyloplasty są zredukowane do śluzowatej masy, która również może ulec zamianie na delikatne masy chlorofilowe, jak to wynika ze spostrzeżeń Schimpera (p. 896).

Skrobia wytwarza się w ciałkach etjolinowych i chloroplastach z cukrów, które się w nich znajdują, spostrzegli to Boehm ('83) i Meyer ('86), badając wpływ cukru na formowanie się skrobi.

Binz ('92) bada powstawanie ziaren skrobi w chloroplastach u *Pellionia Deveauana*. Robi przegląd istniejących wśród uczonych teoryj i wyróżnia trzy okresy, dotyczące powstawania i wzrostu ziarna: pierwszy objaśnia powstawanie ziarna skrobi przez nakładanie — *appositio*, zwolennikami jego są Schleiden, Uger, Crüger i Schacht. W drugim panuje teoria wnikania — *intussusceptio* Nägeli'ego, w trzecim zaś, zapoczątkowanym przez Schimpera, są poglądy podzielone: jedni objaśniają teorią appozycji, inni intussuscepcji. Binz (p. 15) zaobserwował, że ziarno skrobi rośnie w tem miejscu, gdzie jest tworzywka i wywołuje wzrost ziarna przez appozycję, ponieważ taki przyrost odgranicza się ostro od poprzednio zawartego w ziarnie. Kształt tworzącego się ziarna, jego *uwarstwienie do- lub odśrodkowe* zależy od położenia ziarna w two-



rzywce. Jeżeli leży nie w środku, wtedy odżywianie jest jednostronne i powstaje ziarno o budowie odśrodkowej i w późniejszym okresie przy takim ziarnie tworzywka siedzi w postaci czapeczki.

Te warstwy, które biegną dokoła, powstały wtedy, gdy ziarno było całkowicie zanurzone w tworzywce. Zauważył już i Schimper ('81), że współśrodkowe ziarna powstają wtedy, gdy są dokoła otoczone tworzywką, a odśrodkowe, gdy tworzywka jest z jednej strony, z której wywołuje silniejszy wzrost.

Meyer ('95 p. 161) potwierdza spostrzeżenia swych poprzedników, mówiąc, że skrobia od początku aż do końca swego istnienia znajduje się w chromatoforze i uważa, że pogląd Nägeli'ego, jakoby skrobia mogła powstać w soku komórkowym, jest niesłuszny.

Strasburger ('13 p. 168) twierdzi, że ziarna skrobi powstają w leukoplastach, które składają się z substancji białkowej, ponieważ barwią się od jodu, po utrwaleniu ich alkoholem dają reakcję z kw. azotowym i odczynnikiem Millona.

Według Meyera ('20) trofoplasty, tworzywki Mazurkiewicza ('25), *chloro-*, *chromo-* i *leukoplasty* stanowią optycznie jednorodną substancję, której natura białkowa nie jest jeszcze dokładnie mikrochemicznie zbadana.

Stosunkiem amyloplastów do innych morfologicznych składników komórki zajmował się Guillaumond ('12), jak również badał sposób powstawania skrobi w roślinach i przytacza obszerną literaturę, dotyczącą tego przedmiotu.

Pośród trofoplastów największą uwagę zwrócono na chloroplasty i leukoplasty; natomiast najmniej poznano amyloplasty.

Obecnie Zwicker uważa, że najprawdopodobniej jest, że ziarna powstają sposobem nakładania i że potwierdzeniem tego byłoby znalezienie białka wewnątrz ziarna.

Co się zaś tyczy enzymów, działających na skrobię w komórce, to Meyer ('95 p. 169) czyni przypuszczenie, że diastaza wytwarza się w stromie chloroplastów, które wytwarzają skrobię, opierając się jedynie na obserwacji rozpuszczania się ziaren u *Pellionia* i *Diffenbachia*.

---

## II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.

### Metody i odczynniki.

1. Badanie składu chemicznego skrobi, amyloplastów i ich wzajemnego stosunku.

*Ogólne metody przy wykrywaniu substancyj nieorganicznych.*

Mikrochemiczne reakcje na kationy i anjony wykonałam *przedewszystkiem na skrawkach świeżych*, następnie na *skrawkach i ziarnach skrobi, izolowanych przez wymywanie, utrwalonych alkoholem 96% w ciągu 12 godzin i przemywanych wodą* tak długo, aż reakcja na kationy i anjony, niezwiązane organicznie nie była ujemna (Mg, K,  $H_3PO_4$ ); przemywanie wodą destylowaną bieżącą, trwało około 2 dni i wreszcie *na przekrojach przez samo ziarno skrobiowe*. Przekroje przez ziarna skrobiowe wykonałam w następujący sposób: skrobia wypłókana ze skrawków wodą destylowaną, zebrana, przemyta i pozbawiona rozpuszczonego białka i soku komórkowego w ten sposób, jak to podano wyżej, wysuszyłam w tem. pokojowej i następnie zatopiłam w parafinie o niskim punkcie topliwości ( $42^{\circ}$ ), temperatura bowiem kłajstrowania skrobi ziemniaczanej jest wyższa, wynosi  $58,75^{\circ}$ — $62,5^{\circ}$  C, jak podaje Reichert ('83) w tablicy Lippmanna. Po zastygnięciu parafiny robiłam skrawki mikrotomem. Parafinę usuwałam chloroformem w ten sposób, że do skrawków na szkiełku przedmiotowym dodawałam kroplę chloroformu i, aby przeszkodzić wędrowce ziaren podczas przemywania, kładłam wpoprzek szkiełka mały wałeczek z waty szklanej, która stanowiła tamę dla ziaren. Po nakryciu szkiełkiem przykrywkowym, przemywałam kilkakrotnie skrobię chloroformem w celu zupełnego usunięcia parafiny, a potem alkoholem 96%, aby usunąć chloroform i wreszcie alkohol odciągałam bibułą i dodawałam odpowiedniego odczynnika.

Przekroje przez ziarna skrobi wykonywał Pałła d i n ('98) w ten sposób, że mieszał skrobię z proszkiem gumy arabskiej, dodawał wody w celu zarobienia proszku na ciasto, formował pałeczki i po wyschnięciu robił skrawki. Skrawki umieszczał w wodzie, w której guma rozpuszczała się i pozostawały przekroje. Ponieważ guma arabska zawiera substancje mineralne i białko, a przekroje mają służyć właśnie do badania na te substancje, przez ostrożność wolałam używać parafiny niezawierającej, jak wiadomo, powyższych substancyj.

Preparaty z reakcjami, które przebiegały w ciągu dłuższego czasu, przechowywałam w kamerze wilgotnej.

## A. Substancje nieorganiczne.

### K a t j o n y.

#### POTAS.

##### 1. REAKCJA Z AZOTYNEM KOBALTOWO-SODOWYM.

Do reakcji na potas Molisch ('23 p. 63) użył azotynu kobaltowo-sodowego w roztworze 10% kw. octowego zamiast azotynu kobaltu i azotynu sodu, jak czynił to Macallum ('05). Świeżo przyrządzony odczynnik daje z potasem drobne, pomarańczowo-żółte kryształki azotynu kobaltowo-potasowego. Czułość reakcji 1 : 2000, przytem według de Konincka ('81) magnez i wapń nie dają jej.

Na świeżych skrawkach umieszczonych w kropli odczynnika (Tabl. I rys. 1) kryształki występują w amyloplastach, a również wychodzą z obwodu ziaren skrobiowych. Niewiele jednak ziaren daje reakcję na potas, przytem więcej jest małych ziaren pokrytych kryształami, aniżeli dużych. Ziarna skrobi w skrawkach kiełków (kiełkująca bulwa) są bogatsze w potas, niż ziarna skrobi w bulwie. Wnętrze ziarna na przekrojach przez ziarna skrobiowe jest wolne od kryształów.

W celu wyraźniejszego uwidocznienia kryształów azotynu kobaltowo-potasowego, przeprowadzałam je w czarny siarczek kobaltu według przepisu Molischa: nadmiar odczynnika usuwa się 10% kw. azotowym przez przemywanie w ciągu kilku godzin, następnie przemywa się wodą destylowaną i wreszcie skrawek

wkłada się do mieszaniny, złożonej z równych części gliceryny i siarczku amonowego, który otrzymuje się przez nasycenie amonjaku o c. wł. 0,96 siarkowodorem. Reakcja ta potwierdza obrazy otrzymane poprzednio: niewiele jest ziaren najeżonych czarnymi kryształami siarczku kobaltowego, amyloplasty są stale czarne z kryształami.

## 2. CHLOREK PLATYNY 10% ROZTW. W ALKOHOLU 90%.

Haushofer ('85 p. 55) i Schimper ('90 p. 213) używali roztworów wodnych chlorku platyny, lecz Molisch ('23 p. 61) poleca użycie roztworu alkoholowego, co czyni reakcję czulszą. Powstają kryształy chloroplatynianu potasu o barwie słabo żółtej i formie oktaedrów i heksaedrów. Tę samą reakcję daje rubid, cez i amon, lecz w tkance roślinnej może być brany pod uwagę tylko amon, który można usunąć przez spopielenie. Reakcja ta według Molischa jest mniej czuła, niż z azotynem kobaltowo-sodowym.

Umieszczenie kryształów chloroplatynianu potasu otrzymałam takie samo (Tabl. I, rys. 3), jak przy reakcji poprzedniej. Ze względu na amon zrobiłam tę reakcję po spopieleniu izolowanych ziaren przez pociągnięcie skrawka po powierzchni szkiełka przedmiotowego. Pozostały otoczki ziaren i w nich wypadła reakcja dodatnio. Z obutych reakcyj wynika, że potas znajduje się w amyloplastach i na powierzchni ziaren skrobi.

Zwikker (p. 52) uważa, że potas występuje w związku z kw. amylofosforowym w poszczególnych warstwach ziarna. Chcąc się przekonać, czy rzeczywiście potas występuje i we wnętrzu ziarna w połączeniu organicznym, wzięłam ziarna skrobi naświetlane na sucho promieniami lampy kwarcowej i badałam je w azotynie kobaltowo-sodowym. Ziarna takie pobierają wodę z odczynnika, przytem część substancji ziarna ulega rozpuszczeniu i wówczas zarysowują się porozdzielane warstwy odśrodkowe uwarstwienia i promieniowo odchodzące od ośrodeczka długie kryształy, jednak brakuje w jednych i drugich kryształów azotynu kobaltowo-potasowego. Pomimo wszystko, wychodząc z założenia, że potas związany z kw. amylofosforowym, jako substan-



cja organiczna może nie dawać powyższych prób, postąpiłam w ten sposób, jakiego używa Klein ('27) przy badaniu Mg, związanego organicznie: ziarna skrobi, przemyte wodą destylowaną i pozbawione nieorganicznego rozpuszczalnego potasu, poddałam działaniu par bromu, trzymając szkiełko przedmiotowe nad otwartym naczyniem z wodą bromową.

Po kilku godzinach (6 — 8) wykonywałam reakcję na potas z azotynem kobaltowo-sodowym. Przekroje przez ziarno wykazują obecność potasu w otoczce i wnętrzu ziarna, nadto cała powierzchnia ziarna usiana jest kryształami; ziarna naświetlone po bromowaniu również wykazują obecność potasu, lecz brom powoduje zmiany; wskutek zatartej budowy ziarna (wpływ naświetlania i bromowania) nie można oznaczyć umiejscowienia kryształów w poszczególnych warstwach. Mogłam przeto stwierdzić występowanie potasu na powierzchni i wewnątrz ziarna w związku z substancją organiczną, gdy po bromowaniu tworzyła się większa ilość kryształów azotynu kobaltowo-potasowego. Tabl. I., rys. 2 ilustruje przekrojone ziarno skrobi po działaniu bromem z kryształami azotynu kobaltowo-potasowego.

Kostyczew i Eliasberg ('20), a następnie Klein ('29) podają, że według dotychczasowych wyników potas występuje tylko w formie nieorganicznej, organicznie związanego nie znaleziono, co zaś do rozmieszczenia w komórce, to ma się znajdować w soku komórkowym i plazmie, jądro zaś i chromatofory, jak wynika z badań W e v e r s a <sup>1)</sup>, nie zawierają potasu, jednakże S t o k l a s a <sup>2)</sup> znalazł go w chloroplastach. Na znaczenie potasu, a także i magnezu wskazywał już S c h i m p e r ('90 p. 241), przypuszczając, że najważniejsze przemiany materji, zachodzące w komórce, mianowicie synteza węglowodanów, ciał białkowych nuklein, a także tworzenie się uorganizowanych tworów plazmatycznych zależą właśnie od obfitej obecności potasu i magnezu.

Moje badania mikrochemiczne stwierdzają, że potas w formie związku organicznego znajduje się w całej masie ziarna skrobiowego, natomiast potasu organicznego w amy-

<sup>1)</sup> <sup>2)</sup> T u n m a n n ('13) p. 116.

loplastach nie byłam w stanie wykryć za pomocą bromowania, wyrażam przeto tylko przypuszczenie o możliwości występowania potasu i w amyloplacie — jako tworzywce skrobi.

### SÓD.

Octan uranylu według Streng'e ('84) i Schimper'a ('90 p. 215) jest najlepszą reakcją na sól. Przy pomocy tego odczynnika nie udało mi się jednak stwierdzić obecności sodu w amyloplastach i skrobi, jakkolwiek dużo go występuje w soku komórkowym.

### WAPŃ.

Mikrochemicznie Schimper ('90 p. 223) nie wykrył w soku komórkowym bulwy ziemniaczanej rozpuszczonego wapnia, jednakowoż według późniejszych badań Aso ('02) w wodnym wyciągu z ziemniaków znajduje się 0,332% wapnia.

Reakcje, jakie wykonywałam na wapń, mogę podzielić na dwie grupy: reakcje na skrawkach i reakcje na izolowanych spozielonych ziarnach.

#### 1. Reakcja na skrawkach.

Wapń można wykryć mikroskopowo, jako gips, szczawian, węglan, fluorokrzemian, jednak najpewniejsza i najczulsza jest metoda Haushofer'a ('85 p. 32), prowadząca do powstania gipsu, nadto z krystalicznych reakcyj na wapń Rosenthaler ('28) używa 10% kwasu jodowego.

#### 1. KWAS SIARKOWY:

Według Tumanna ('13 p. 116) nie można podać ogólnego przepisu na stężenie kwasu, ponieważ szybsze lub wolniejsze tworzenie się kryształów zależy od różnych czynników, między innymi od rodzaju połączenia wapnia. Im mocniejszy kwas, tem prędzej powstają kryształy i to przeważnie igły, zebrane w gwiazdki. Schimper ('90 p. 211) podaje czułość reakcji 1 : 50000.

a) *Kwas siarkowy 2 — 3%* nie daje kryształów gipsu. Po ulotnieniu się wody, gdy stężenie kwasu wzrosło, ziarna pęczniały i zarysowała się otoczka, lecz obecności kryształów nie udało mi się stwierdzić.

b) *Schujenino*ff ('97) zaleca najpierw potraktować skrawek 40% alkoholem, a potem dodać kroplę 2,5 — 3% kwasu siarkowego, jednak i ta modyfikacja nie dała wyniku.

c) *Użyłam silniejszych stężeń kwasu siarkowego: 5 — 10%* w roztworze wodnym (mocniejszego kwasu i ogrzewania nie mogłam zastosować, ponieważ ziarna skrobi zostają silnie uszkodzone), jak również 10% roztworu kwasu siarkowego w 80% alkoholu, aby zmniejszyć rozpuszczalność siarczanu wapnia, lecz były to próby bezskuteczne.

## 2. PRÓBY WYKRYCIA WAPNIA JAKO SZCZAWIANU, WĘGLANU, JODANU,

według przepisów: *Schimpera* ('90 p. 211), *Haushofera* ('85 p. 34), *Molisch*a ('16), również nie dały rezultatu.

Mając jednak na uwadze, że wapń powinien się znajdować w amyloplastach i na skrobi, przynajmniej w warstwie obwodowej, jako resztką amyloplasty, ponieważ stwierdzono jego obecność w chloroplastach i jądrze<sup>1)</sup>, a także w elajoplastach<sup>2)</sup>, a więc w uorganizowanych składnikach komórki, biorących udział w przemianie materji, więc dziwne byłoby, gdyby amyloplasty nie zawierały go, przerabiałam wszystkie reakcje na wapń.

## 3. Z REAKCYJ BARWNYCH NA WAPŃ, STOSOWANYCH W TKANKACH ZWIERZĘCYCH<sup>3)</sup>:

- a) *Kossa* ('01) z *pyrogale*ni,
- b) *Salomona* ('14) z *antrapurpuryną*,
- c) *Grandi i Mainini* ('900) z *purpuryną*,
- d) *Leuterta* ('95) z *hemateiną*,

dotatni wynik dała próba *Grandi i Mainini* wykonana w następujący sposób: preparat pozostaje w ciągu 5 — 10 min w roztworze alkoholowym purpuryny (0,2 : 100), następnie kilka minut w 0,75% roztworze chlorku sodowego i w 70%

<sup>1)</sup> *Tunmann* ('13) p. 115.

<sup>2)</sup> *Mazurkiewicz W.* ('26), *Grochowski W.*

<sup>3)</sup> *Abderhalden E.* *Handbuch* p. 442.

alkoholu aż do odbarwienia. Sole wapnia dają nierozpuszczalny strąć o zabarwieniu czerwonym z odcieniem różowym lub żółtym, zależnie od anjonu, a więc węglan daje różowo-czerwone zabarwienie, fosforan obojętny — żółto-czerwone, siarczan — żółtawo-czerwone. Ziarna skrobi i amyloplasty miały zabarwienie słabe, żółto-czerwone. Zabarwienie to wskazywałoby, że wapń występuje w amyloplastach i na skrobi w postaci fosforanu, lecz ponieważ powstałe zabarwienie było słabe, a siarczan wapniowy daje podobną barwę, więc trudno z tego zabarwienia sądzić o połączeniu, w jakim się znajduje wapń.

e) *Alizarynosulfonian sodu* w stęż. wodnym roztworze, używany do wykazania rozpuszczonego wapnia w protoplazmie w postaci czerwonego strątu przez Pollacka i Herberta ('28), barwi powierzchnię ziarna skrobi na czerwono, zabarwienie mocniejsze jest przy obwodzie ziarna, amyloplasty są silniej zabarwione na czerwono. Reakcja ta jest lepsza, niż poprzednia, ponieważ daje mocniejsze zabarwienie i jest prostsza w użyciu.

Te dwie dodatnie barwne reakcje wskazują na prawdopodobną obecność wapnia w połączeniu organicznym w amyloplacie i na ziarnie skrobi, dążąc jednak do otrzymania najpewniejszej krystalizacji reakcji na wapń organiczny, wykonałam próbę ze spopieleniem.

## II. Reakcje na spopielenych ziarnach.

Izolowane ziarna skrobi spalałam ostrożnie na szkiełku przedmiotowym, ogrzewając dotąd, dopóki ziarna nie przybrały szarego zabarwienia po początkowym zczernieniu i zachowały jeszcze swoje zarysy (obserwacje pod mikroskopem). Po ostygnięciu podzialałam 10% kw. siarkowym w 80% alkoholu i po kilku godzinach otrzymałam obraz taki: żółto-brunatne otoczki ziaren, wewnątrz ziarna puste, gdzie była amyloza, która uległa spaleni, amylopektyna zaś, występująca w otoczce, trudniej spala się, więc dlatego pozostał szkielet ziarna, do czego przyczynia się jeszcze obecność w amylopektynie krzemionki<sup>1)</sup>; z pozostałych

<sup>1)</sup> Samec ('27) p. 19.



więc otoczek wychodzą igły pojedyncze, lub zebrane w pęczki, Umiejscowienie siarczanu (Tabl. II, rys. 1) wapnia wypadło bardzo dokładnie, ogranicza się ono tylko do otoczki ziarna. Na to, aby wyróżnić amyloplasty po spaleniu, niema żadnego sposobu; biorąc jednak pod uwagę jednakowe zachowanie się amyloplastów i ziaren skrobi względem purpuryny i alizarynosulfonianu sodu, można przypuścić, że wapń znajduje się i w amyloplastach. Że wapń występuje w ziarnach skrobiowych w związku z substancją organiczną, potwierdza to również jego zachowanie się względem kw. siarkowego, wchodzi bowiem z nim w reakcję dopiero po spaleniu substancji organicznej. Pozostaje tedy do rozstrzygnięcia, czy wapń występuje w związku z kwasem amylofosforowym, wchodzącym w skład otoczki-amylopektyny — według teorii o kw. amylofosforowym *S a m e c'a*, jako sól wapniowa tego kwasu, czy w związku z białkiem, jako albuminat. Wiadomo bowiem, że nierozpuszczalne sole wapnia, jak siarczan, węglan, fosforan mają zdolność rozpuszczania się w białkach, tworząc albuminaty, *P a u l i i S t e n z i g e r* ('29) badali rozpuszczalność tych soli. Ponieważ wapń występuje w ziarnie w bardzo małej ilości, więc można byłoby przypuścić, że zgodnie z umiejscowieniem, stanowi on składnik amyloplastu, powlekającego ziarno (występowanie amyloplastu na powierzchni ziarna zostanie udowodnione przy reakcjach na białko).

Za związkiem soli wapniowych z białkiem całkowitego amyloplastu przemawiają badania *L o e w'a* ('92, '03) nad zawartością wapniowych połączeń nukleiny lub plastyny w jądrze i plastydach; co się tyczy ziarna skrobiowego, to wapń tak dobrze może być połączony z białkiem resztki amyloplastu, jak i z kwasem amylofosforowym otoczki amylopektynowej, nie mamy bowiem odpowiednich mikrochemicznych reakcyj, odróżniających te połączenia.

## MAGNEZ.

Magnez wykrywałam jako fosforan amonowo-magnezowy według przepisu *Richtera* ('02), jest to najdokładniejsze oznaczenie, podawane już przez *P f e f f e r a* ('72), *H a u s h o f e r a* ('85 p. 92) i *S c h i m p e r a* ('90 p. 214). Fosforan amonowo-ma-

gnezowy krystalizuje w układzie rombowym, tworząc kryształy w formie daszków, litery *x* i *H*, śnieżynek i piórkowatych kryształów; te różne postacie dokładnie opisuje *H a u s h o f e r* w swojej mikrochemji. Takie jest wykrywanie nieorganicznego magnezu; magnez organicznie związany wykrywał *M o l i s c h* ('23 p. 59) po spopieleniu, a *K l e i n* ('27) po bromowaniu, a więc po uwolnieniu magnezu ze związku z substancją organiczną.

### *I. Reakcja na świeżych skrawkach.*

Skrawek w kropli 0,1% fosforanu amonowo-sodowego poddawałam działaniu par amonjaku w ciągu kilku minut, trzymając szkiełko przedmiotowe nad otwartem naczyniem ze stężonym amonjakiem. Kryształy w formie daszka występowały na ziarnach skrobi i amyloplastach w niewielkiej ilości. Dowodziłoby to, że magnezu nieorganicznego jest mało, a ponieważ sok komórkowy zawiera go dużo, więc właśnie mógł stąd pochodzić. (Tablica I, rys. 4).

Z powyższych względów postąpiłam w ten sposób, że skrawki utrwalone alkoholem i wytrząśnięte ziarna skrobi przemywałam wodą destylowaną tak długo, aż próba na magnez nieorganiczny wypadła ujemnie (przemywanie trwało około 2 dni), następnie niszczyłam substancję organiczną według metody *K l e i n a* ('27).

*K l e i n* podaje sposób wykrycia magnezu w chlorofilu (zeleni) i innych związkach organicznych w ten sposób, że skrawki przemyte wodą i pozbawione nieorganicznego magnezu, trzymam mokre nad naczyniem z bromem. Po kilku godzinach działania par bromu, przed dodaniem fosforanu amonowo - magnezowego, usuwa brom przez pozostawienie skrawka na powietrzu lub przez trzymanie go nad amonjakiem.

### *II. Reakcje na magnez po zniszczeniu substancji organicznej.*

1. *Ziarna skrobi po działaniu parami bromu* wykazują znaczną ilość kryształów fosforanu amonowo - magnezowego, niema jednak dobrego umiejscowienia, ziarno bowiem jest silnie zmienne, napęczniałe, przytem kryształy występują tak na całej powierzchni ziarna, jak również i poza ziarnem, co można objaśnić

tem, że woda wylugowuje magnez podczas utleniania substancji organicznej bromem. (Tablica I, rys. 6).

## 2. *Próba ze spoieleniem* dała ściślejszą lokalizację.

Ziarna skrobi przygotowane tak, jak do bromu, spalałam na szkiełku przedmiotowym. Po zastosowaniu fosforanu amonowo-magnezowego otrzymywałam kryształki w formie X, wychodzące z otoczki ziarna. (Tablica I, rys. 5).

Przy pomocy tych dwóch reakcyj mogłam stwierdzić występowanie magnezu, związanego z substancją organiczną w ziarnie skrobi; ponieważ amyloplasty zostają uszkodzone przy metodzie Kleina, nie mogłam więc wykazać w nich tą metodą magnezu. Jeżeli porównać zawartość potasu i magnezu z obfitością tworzących się kryształów, to można powiedzieć, że magnezu jest znacznie mniej. Ze względu na występowanie organicznego magnezu w ziarnach skrobiowych, można przypuścić, że i amyloplasty, zmieniające się pod wpływem światła na chloroplasty, o czym będzie mowa dalej, zawierają również organiczny magnez.

## A n j o n y.

### KRZEM.

Ze wszystkich metod, stosowanych do wykrycia krzemionki, najdogodniejszą okazała się metoda K ü s t e r a ('97), opisana niżej, ponieważ daje możność wykazania umiejscowienia krzemu bez naruszenia jego związku z substancją organiczną.

Inne metody np. spoielenie wprost, spalanie z jednoczesnem dodaniem stężonego kwasu siarkowego, jak robi to S a c h s lub zwęglanie z kw. siarkowym stężonym, a potem dodanie 20% kw. chromowego w celu zupełnego rozłożenia substancji organicznej według M i l i a r a k i s a ('84) były niedogodne, ponieważ zmierzają do całkowitego zniszczenia substancji organicznej i pozostawienia szkieletu krzemionkowego.

W ziarnach skrobi krzemionki jest mało, według S a m e c'a ('27 p. 19) — 0,077% i otrzymanie szkieletu krzemionkowego przy stosowaniu mocnych kwasów i jednoczesnem ogrzewaniu jest niemożliwe, ponieważ ziarno skrobi zwiększa wielokrotnie swą objętość, silnie pęczniejąc. Tylko spoielenie wysuszono-



nych ziaren przez ostrożne ogrzewanie prowadzi do otrzymania otoczek ziaren skrobi; otoczka jest brunatna i w niej widać rzadko rozmieszczone jaśniejsze ziarenka, co przedstawione jest na tablicy II, rys. 2a.

Ziarenka te rozpuszczają się w kwasie fluorowodorowym, pozostaje wtedy jasna otoczka amylopektynowa, a z odczynkiem K ü s t e r a przyjmują czerwony połysk.

W celu wykazania krzemu K ü s t e r używa fenolu lub benzolu, a następnie olejku goździkowego. W benzolu ciała i błony skrzemieniałe nabierają niebieskiego połysku. Obserwacja jednak jest utrudniona z powodu szybkiego ulatniania się benzolu. Wygodniejsza jest przeto próba z fenolem, którą K ü s t e r ('97) wykonywa w ten sposób: na suchy skrawek kładzie odrobinę fenolu krystalicznego i stapia go nad ogniem, następnie usuwa płyn i zastępuje go olejkiem goździkowym. Ciała przepojone krzemionką wykazują czerwony albo niebieski połysk. K ü s t e r nie jest w stanie wyjaśnić tego zjawiska, uważa jednak, że nie zależy ono jedynie od uwarstwienia, spowodowanego budową lamellarną (*Lamellarschichtung*), lecz i od innych nieznanych czynników. Obecnie P f e i f f e r ('30) zebrał literaturę dotyczącą reakcyj barwnych na  $\text{SiO}_2$  przy pomocy różnych barwników, jak np. błękitu metylenowego, czerwieni obojętnej i przedstawia pogląd różnych autorów, a zarazem i swój, że pod wpływem tych barwników następuje zmiana w dyspersji kw. krzemowego, polegająca na dehydratacji solu, w jakim znajduje się  $\text{SiO}_2$  w komórcie i następnie adsorbcja przez powstały żel. Przepojenie zaś fenolem ma wpływać na zwiększenie strątu w hydrożelu  $\text{SiO}_2$ .

Metodę K ü s t e r a nazwano prześwietlającą, ponieważ widoczne są tylko elementy skrzemieniałe, błony zaś komórek, niezawierające krzemu, oraz inne składniki komórki stają się niewidzialne pod mikroskopem.

N e u m a n n ('16) poleca używać zamiast fenolu eugenol.

Zarówno reakcje z fenolem, jak z benzołem i eugenolem wykonywałam na skrawkach wysuszonych na powietrzu albo przemytych alkoholem, celem usunięcia wody, aby zapobiec tworzeniu się emulsji z odczynnikami.

Skrawek, po stopieniu w fenolu, w olejku goździkowym: Ziarna skrobi i amylopla-



sty są różowe, jednak zabarwienie amyloplasty jest znacznie słabsze. Na różowo zabarwionem ziarnie wyróżnia się mocniej zabarwiony na czerwony kolor ośrodek. Na przekroju przez ziarno skrobi widać różowo zabarwioną otoczkę, w której wybitnie zaznaczają się czerwone ziarenka, jako większe nagromadzenie krzemionki. Zabarwiona otoczka ostro odgranicza się od różowo zabarwionej części środkowej. Tabl. II, rys. 2b.

Stosowanie ogrzewania przy stapianiu fenolu nie powoduje zmian w ziarnie, ponieważ temperatura topliwości fenolu wynosi  $38 - 41^{\circ}\text{C}$ .

Eugenol daje ten sam obraz.

Sam olejek goździkowy również daje zabarwienie różowe (składnikiem olejku jest eugenol), efekt więc ten sam, co przy reakcji fenol+olejek goździkowy, a wykonanie reakcji jest o wiele prostsze.

W benzolu występuje zabarwienie niebieskie o natężeniu słabszym, niż przy fenolu, skoro następnie odciągnąć benzol i dodać olejku goździkowego, zabarwienie z niebieskiego przechodzi w różowe.

Polecany przez Pfeiffera ('29) błękit metylenowy, mający zastąpić metodę prześwietlającą Küstera, jest jeszcze mniej specyficzny, niż fenol i olejek goździkowy. Według moich badań ziarna skrobi odbarwiają błękit metylenowy, co musi być przypisane działaniu oksydoredukazy, a więc odczynnik ten nie nadaje się do wykrycia krzemu na ziarnach skrobi, ponieważ elementy przepojone krzemionką, adsorbując błękit, zabarwiają się na żółty kolor, a więc następuje zmiana barw. Stosując jednak barwienie błękitem metylenowym szkieletów ziaren skrobi, otrzymanych przez spopielenie, osiągnęłam wynik podobny, jak przy działaniu odczynnikami Küstera, a więc słabo żółto zabarwione ziarenka, występujące w otoczkach. Barwienie jednak szkieletów krzemionkowych różnymi barwikami, używanymi przez Kaisermanna ('10) nie prowadzi do celu.

Po stwierdzeniu lokalizacji kwasu krzemowego metodą Küstera, zrobiłam jakościową próbę na krzem, według przepisu Haushofera ('85), działając kw. fluorowodorowym i roztwo-

rem *chlorku sodu* na izolowane ziarna skrobi. Ziarno ulega pęcznieniu, pozostaje otoczka, poza którą w płynie tworzy się natychmiast masa heksagonalnych kryształów fluorokrzemianu sodu formy sześciokątnych tafelek, gwiazdek, słupków. Cokolwiek lepiej wypada próba z samym kw. fluorowodorowym na ziarnach przemytych od soli rozpuszczalnych: po  $\frac{1}{2}$  godziny tworzą się kryształy, czasami nawet wychodzą z otoczki ziarna; są one przeważnie heksaedrami, a więc jest to fluorokrzemian potasu, zgodnie z opisem formy krystalicznej dla tej soli <sup>1)</sup>). Występujący w skrobi krzem i potas dają pod wpływem kw. fluorowodorowego fluorokrzemian potasu.

Obie reakcje wykonałam na płytkach celuloidowych, obserwując pod mikroskopem, którego obiektywy były zabezpieczone od działania kwasu płytkami celuloidowymi, przyklepionymi balsamem kanadyjskim <sup>2)</sup>).

Metodą Küstera mogłam stwierdzić, że krzem występuje w większej ilości w otoczce, mniejszej we wnętrzu ziarna, w jeszcze mniejszej w amylopląście.

Krzemionka więc zostaje zużyta przez amyloplast na budowę ziarna skrobi. Badanie mikrochemiczne, dokonane przeze mnie, zgadza się w pewnej mierze z wynikami, otrzymanymi przez Samęc'a nad rozmieszczeniem kw. krzemowego w ziarnie, albowiem według niego amyloza wolna jest od kw. krzemowego, natomiast zawiera go amylopektyna <sup>3)</sup>). Otrzymawszy zaś trzy fazy rozproszenia substancji skrobiowej przez naświetlenie promieniami ultrafioletowymi i odzielenie gelu przez odcentryfugowanie i elektrodializę od soli, Samęc oznaczył w każdej części zawartość  $\text{SiO}_2$  i podał, że stroma części zewnętrznej i wewnętrznej zawiera równą ilość krzemionki, substancja zaś wewnętrzna nie posiada krzemu <sup>4)</sup>).

<sup>1)</sup> Haushofer p. 57.

<sup>2)</sup> Sposób Behrensa, przytacza Molisch ('23) p. 14.

<sup>3)</sup> Kolloidchemie der Stärke p. 19.

<sup>4)</sup> ibidem p. 89.

Na przekroju przez ziarno właśnie wewnętrzna część jest jaśniejsza w odczynniku Küstera, ponieważ tu na zmniejszenie krzemionki wpływa substancja wewnętrzna — amyloza.

## FOSFOR.

Mikrochemicznie kwas fosforowy wykrywał molibdenianem amonowym Hansen ('85) i Haushofer ('85) a mieszaniną magnezową Pfeffer ('72).

Z molibdenianem amonowym powstają żółte kryształy, oktaedry, heksaedry o zaokrąglonych brzegach. Kryształy robią wrażenie żółtych kropeł o czarnym obwodzie.

Z mieszaniną magnezową powstają kryształy fosforanu amonowo-magnezowego takiej postaci, jak przy badaniu na magnez.

Przy pierwszym odczynniku przeszkadza obecność niektórych związków organicznych, a kwas krzemowy daje podobny strą<sup>1)</sup>. Oba te odczynniki bezpośrednio użyte pozwalają tylko na wykrycie fosforanów, a więc fosforu nieorganicznego. Gdy chodzi o fosfor organiczny, obiekt spopielało i w popiele oznaczano fosforany, jak to uczynił Pfeffer ('72) przy badaniu globoidów aleuronu. Salomon ('14) strącał mieszaniną magnezową fosforany nieorganiczne, a po ich usunięciu działał molibdenianem w ciągu dłuższego czasu; obecny w odczynniku kwas azotowy uwalniał fosfor z połączenia organicznego.

Inne metody, polegające na występowaniu zabarwienia dzięki redukcji kw. molibdenowego, związanego z kw. fosforowym w połączeniu białkowym, bądźto zapomocą pyrogalolu, jak czynią to Lilienfeld i Monti ('92), lub przy pomocy chlorku cynku, jak robi to Polacci ('94—95) albo wreszcie sposób Macalla ('98 i '99), który otrzymuje zabarwienie niebieskie po przeniesieniu skrawka z molibdenianu amonowego do fenylohydrazyny, nie mają żadnego znaczenia, ponieważ reakcje te dają również i białka, niezawierające kw. fosforowego a także i związki niebiałkowe.

Pierwsza metoda była już w rok po ogłoszeniu uznana za nieracjonalną przez Raciborskiego ('93).

Dopiero Klein ('26) znalazł sposób wykrycia związanego organicznie fosforu. Działał on dwutlenkiem wodoru w obecno-

<sup>1)</sup> Schimper ('90) p. 216.



ści katalizatora, przyczem substancja organiczna ulegała utlenieniu i kw. fosforowy uwalniał się. Według tego autora można w ten sam sposób odczepić organicznie związaną siarkę i metale, jak np. żelazo, które trudno wykryć, gdy jest związane z substancją organiczną. Białka, które z molibdenianem nie dają reakcji, po utlenieniu  $H_2O_2$  dają obfity osad. Białka roślinne: nukleoproteidy, kwasy nukleinowe, witelina, fitina (globoidy w aleuronie), fosfatydy (fosforolipoidy) i kwas heksozofosforowy dają reakcję na fosfor przy zastosowaniu metody K l e i n a.

*Metoda postępowania:* skrawek zanurzyć na krótko do wrzącej wody lub utrwalić w ciągu 2 godzin 96% alkoholem, przemywać bieżącą wodą przez 48 godz., aby usunąć nieorganiczny fosfor. W celu usunięcia trudno rozpuszczalnych fosforanów wapnia i magnezu przemyć skrawek kwasem azotowym o stężeniu odczynnika molibdenianu amonowego, a potem, jak wyżej, wodą.

Następnie włożyć skrawki na 2 godz. do 5% roztworu katalizatora (azotan żelazowy + kropla dym. kw. azotowego). Po wyjęciu z katalizatora włożyć na minutę do miseczki z perhydrolu (30%), skrawek przenieść na szkiełko przedmiotowe z wgłębieniem i dodać kroplę perhydrolu. Wywiązywanie gazu jest bardzo silne, gdyż cała tkanka jest przepojona katalizatorem. Czekając, aż tkanka będzie przemacerowana 1 — 2 godz. i nadmiar perhydrolu usuwa się pyłem cynkowym, który działa tak długo aż kropla płynu ulotni się, wtedy dopiero po dodaniu odczynnika (molibdenianu) wypadają w krótkim czasie żółte gwiazdki. Skrawki, które nie dawały reakcji molibdenowej po kilkugodzinnej działaniu, jak również z kw. azotowym różnej koncentracji, dają ją po perhydrolu. Można zrobić próbę i z mieszaniną magnezową. Ilość fosforu po dwutlenku wodoru równa się ilości otrzymanej po spaleniu.

Podobnie, jak przy badaniu siarki i opisanego już magnezu, próbował K l e i n ('27) i przy fosforze użyć metody bromowania: działania parami bromu w ciągu 12 godz. na skrawek umieszczony w kropli wody na szkiełku przedmiotowym, które trzymane jest nad miseczką z bromem. Metoda ta daje mniejszą ilość fosforu, niż z perhydrolu, część bowiem fosforu ulatnia się.



Na skrawki i izolowane przez wytrząsanie ziarna skrobi, utrwalone alkoholem i po usunięciu przez przemywanie wodą fosforanów nieorganicznych w ten sposób, jak podaje Klein, podzielałam:

#### 1. MOLIBDENIANEM AMONOWYM:

(roztwór 1,0 molibdenianu amonowego w 12-cc kw. azotowego o c. wł. 1,18 według przepisu H a n s e n a), ziarno ulega pęcznieniu i wreszcie zniszczeniu, i po kilku godzinach zjawiają się w niewielkiej ilości żółte kryształy. Skoro zaś tak przygotowane ziarna poddawałam działaniu perhydrołu tak długo, aż amyloza uległa utlenieniu, ziarna straciły uwarstwienie, a amylopektynowa otoczka wyraźnie uwidoczniła się, wówczas po dodaniu molibdenianu amonowego natychmiast i to w dużej, w większej, niż poprzednio, ilości wypadają kryształy molibdenianu fosforo-amonowego. Przytem o ile przed użyciem dwutlenku wodoru nie można było oznaczyć jakiegokolwiek lokalizacji, o tyle teraz uwidoczniły się zgrupowane kryształy na miejscu ziarna skrobi, zniszczonego przez kwas azotowy odczynnika.

#### 2. MIESZANINĄ MAGNEZOWĄ:

Najdogodniejszy skład odczynnika podaje Zimmermann ('92), jest to mieszanina 25 objętości stężonego wodnego roztworu siarczanu magnezu, 2 obj. stęż. wodnego roztworu chlorku amonowego i 15 obj. wody.

Na powierzchni, zmienionych przez utlenianie, ziaren wypadają kryształy fosforanu amonowo-magnezowego (por magnez). Oba odczynniki, użyte po utlenieniu perhydrolem, nie dają dobrego umiejscowienia, pozwalają jednak na zupełnie pewne stwierdzenie organicznego fosforu w ziarnach skrobi.

Jasne jest, że przy pomocy powyższych odczynników nie mogłam zbadać w jakim połączeniu organicznym występuje fosfor w ziarnach skrobiowych.

#### SIARKA

Badając amyloplasty i ziarna skrobi na obecność siarki, można zgóry powiedzieć, że może ona występować w nich tylko

w związku z substancją białkową. Mulder ('37) badał ciała białkowe na zawartość siarki i fosforu. Liebig i Laskowski ('46) stwierdzili obecność siarki w proteinowych preparatach Muldera. Również Osborne ('10) wykazał siarkę w bardzo wielu białkach roślinnych, w których występuje w postaci, zawierającego siarkę aminokwasu, cystyny.

Według późniejszych badań C. Mörnerna ('14) nie cała siarka znajdująca się w cząsteczce białka występuje w formie cystyny, siarkę zawierają również i inne kompleksy białka.

Mikrochemiczne reakcje na siarkę organiczną polegają na wykryciu kwasu siarkowego, powstałego przez rozłożenie białka i utlenienie otrzymanej z rozpadu siarki do kwasu siarkowego. Tak czyni to Neuberger i Mandel ('15), a także Klein ('27).

Tunmann ('13 p. 7) wykrył siarkę w białku i w aleuronie u Semen Strychni chlorkiem barowym po uprzedniej krótkiej hydrolizie kwasem solnym, jest to jednak wypadek szczególny. Gola ('02) wykrywał siarkę alkalicznym roztworem nitroprusydki sodowego, lecz metoda ta, według Kleina, nie może być godna polecenia. Klein ('27) podaje własną metodę, polegającą na odczepieniu i jednoczesnym utlenieniu siarki przy pomocy bromu tak, jak to robił Emich ('93) przy makrochemicznym wykryciu siarki w siarczkach nieorganicznych i siarki w olejku gorczyczym. Klein próbował również metody Neubergera utleniania dwutlenkiem wodoru wobec katalizatora tak, jak czynił to przy fosforze ('26), lecz uważa, że metoda ta jest gorsza od metody utleniania bromem, ponieważ tylko część siarki zostaje uwolniona z połączenia organicznego i wykrywa się mniejszą ilość siarki, niż przy metodzie bromowej lub po spożyciu.

### Utlenianie dwutlenkiem wodoru.

Izolowane ziarna skrobi przygotowałam w ten sam sposób, jak przy badaniu na fosfor, przemywając jednak wodą krótko, ponieważ chlorek barowy nie wykazuje obecności siarczanów, co spostrzegł już Schimper ('90). Utlenianie przeprowadzałam również w ten sposób, jak przy fosforze.

Po skończonem utlenianiu, gdy ziarna skrobi miały jeszcze dobrze zachowaną otoczkę i gdy płyn ulotnił się, *dodałam kroplę roztworu chlorku baru* (1 : 10). Po 12 godzinach można było zaobserwować na powierzchni ziarna drobny strą. (Tablica II, rys. 3).

### Utlenianie bromem.

Ziarna skrobi przygotowano tak, jak przy poprzedniej metodzie, następnie w kropli wody na szkiełku przedmiotowem poddano je działaniu par bromu tak, jak przy magnezie. Po kilku godzinach działania (8—12) usunęłam brom parami amonjaku i dodałam azotanu strontu (roztwór 1 : 10). Klein ('27) zaleca użycie chlorku wapniowego, który jest mniej czuły, lecz zato daje charakterystyczne igły gipsu. Stosując jednak chlorek wapniowy, nie osiągnęłam zadowalającego wyniku, przy użyciu zaś azotanu strontu tak, jak czyni to Haushofer ('85 p. 116), otrzymałam na ziarnach skrobi rombowe tafelki, podczas gdy poprzednio był bezpostaciowy osad. Ścisłejsze umiejscowienie kryształów na ziarnach skrobi otrzymałam, skoro ziarna w kropli azotanu strontu, zamiast wody, poddałam działaniu bromu; po skończonem bromowaniu, gdy brom ulotnił się i ziarna odbarwiły, przykryłam szkiełkiem nakrywkowem i obserwowałam pod mikroskopem. Rysunek 4 na tablicy II przedstawia ziarno *b*, na którego powierzchni występują tafelki siarczanu strontu, także same kryształy znajdują się i w amylopląście (*c*). Występowanie siarczanu strontu nie ogranicza się tylko do części obwodowej ziarna, ponieważ kryształy można spostrzec i na przekrojach przez ziarno; kryształy wychodzą z otoczki i części środkowej ziarna (ziarno *a*), jednak jest ich mniej, a więc siarka znajduje się zarówno na powierzchni, jak i we wnętrzu ziarna.

Dodatknie wyniki reakcji, po utlenieniu dwutlenkiem wodoru, z chlorkiem baru, a również, po utlenieniu bromem, z azotanem strontu wskazują na występowanie organicznej siarki na powierzchni, w otoczce i części wewnętrznej ziarna.

## B. Substancje organiczne.

### 1. CIAŁA BIAŁKOWE.

#### OGÓLNE METODY PRZY WYKRYWANIU CIAŁ BIAŁKOWYCH.

Z różnych płynów utrwalających białko<sup>1)</sup>, jak to woda wrząca, alkohol, sublimat, formaldehyd, kwas osmowy, chromowy, pikrynowy i specjalnie używanych do utrwalenia leukoplastów, a więc odczynnik F l e m m i n g a<sup>2)</sup> i inne jeszcze bardziej skomplikowane metody, wybrałam alkohol, aby uniknąć dużych zmian w białku. Przy utrwaleniu bowiem innymi płynami, np. 2% alkoholowym roztworem sublimatu, otrzymałam nie przy wszystkich reakcjach białkowych wyniki te same, co na skrawkach świeżych i utrwalonych alkoholem. Utrwalenie wodą wrzącą musiało być wykluczone ze względu na kłajstrowanie się skrobi. Tylko w jednym wypadku, przy reakcji S a k a g u c h i'ego. użyłam metody utrwalenia, podanej przez K r e t z a ('22), a więc działanie 2% roztw. formaldehydu w ciągu 1/2 godziny i 2-godzinne przemywanie bieżącą wodą.

Świeże skrawki służyły do badań z odczynnikiem w roztworach wodnych, utrwalone zaś alkoholem 96% w ciągu 12 godzin do większości reakcyj białkowych, wywoływanych przez mocny ług i kwasy.

Ziarna skrobi izolowałam przez wytrząsanie skrawków w alkoholu i kilkakrotnie przemycie alkoholem, celem usunięcia resztek plazmy i soku komórkowego. Ponieważ szereg reakcyj białkowych dają również i ciała niebiałkowe, pochodzenia aromatycznego, np. fenole, należałoby w razie ich występowania używać do przemywania płynów usuwających je. Nie potrzebowałam tego robić, ponieważ w ziemniakach tego rodzaju związków nie wykryto.

Przekroje przez ziarna skrobi wykonywałam przy pomocy mikrotomu po utrwaleniu i zatopieniu skrobi w parafinie.

Przy reakcjach, w których były użyte lotne płyny, łatwo zmieniające stężenie, oprowadzałam brzegi szkiełka nakrywkowego waseliną, a do obserwacji mikroskopowej reakcyj barwnych używałam apochromatu.

1) M e y e r ('20) *Analyse der Zelle* p. 483.

2) *ibidem* p. 170.



## REAKCJE BARWNE NA BIAŁKO.

## 1. REAKCJA KSANTOPROTEINOWA.

Mulder ('39) użył stężonego kwasu azotowego do makrochemicznej próby na białko, a Van der Prants ('49) wprowadził go do mikrochemii, przytem, dodając amonjaku wzmacniał zabarwienie żółte do brunatno-żółtego. Scherer ('57) przypuszczał, że żółte zabarwienie zależy od produktu rozpadu ciał białkowych, tyrozyny, późniejsze zaś badanie Inouye'a ('12) i Mörrera ('19) stwierdzają, że w reakcji ksantoproteinowej bierze udział nie tylko tyrozyna, lecz i tryptofan. Czułość reakcji według Fürtha ('99) wynosi 1 : 21000. Nickel ('90) podaje, że oprócz związków białkowych, również balsamy i żywice dają żółte zabarwienie; zawierają one jednak azot, który wchodzi w skład białka sekretogenów, wytwarzających olejki, balsamy i żywice, jak to udowodnił A. Ossowski ('27), stąd też pochodzi dodatnia reakcja ksantoproteinowa.

Reakcja ksantoproteinowa uwarunkowana jest występowaniem kompleksu aromatycznego lub tryptofanu<sup>1)</sup>, jednakże Lieben ('24), Tillmans, Hirsch i Stoppel ('28) twierdzą, że inne kwasy aminowe nie dają tej reakcji, tylko tyrozyna i tryptofan. Tyrozyna ulega zamianie na nitrotyrozynę, co zaś dzieje się z tryptofanem — nie wiadomo. Używano różnych stężeń kwasu 65%, do oznaczeń kolorymetrycznych 20%<sup>2)</sup> i  $\frac{1}{10}$  N<sup>3)</sup>. Tillmans, Hirsch i Stoppel podają, że stężenie kwasu i czas trwania reakcji jest ważny: skoro użyć stężonego kwasu i ogrzać, zabarwienie słabnie i wreszcie znika, słaby kwas nie daje znowu najsilniejszego zabarwienia, dlatego też używali słabego N/10 kwasu i ogrzewali w ciągu 2 godzin.

Najlepszym okazał się kwas azotowy 20%, który nie uszkadza amyloplastów i ziaren skrobi w ciągu dłuższego czasu. Amyloplasty i powierzchnia ziaren skrobi żółkną, po dodaniu zaś amonjaku występuje silniejsze zabarwienie; na przekroju

---

1) Hoppe-Seyler ('24) p. 294, 449.

2) Mörrer ('19).

3) Tillmans u. Mitarbeiter ('28) p. 381.

przez ziarno otoczka barwi się, wewnątrz ziarna nie.

Kwas 65%: amyloplast momentalnie rozpływa się, zabarwienie niewidoczne; po zniszczeniu amyloplasty ziarno skrobię i pozostaje słabo zabarwiona otoczka. Szczególnie dobrze widać różnicę w zabarwieniu otoczki i wnętrza ziarna na przekrojach przez ziarno: otoczka przyjmuje żółte zabarwienie, wewnątrz zaś ziarna rozpuszcza się, pozostają jednak na bezbarwnym tle żółtawe ziarenka o zabarwieniu znacznie słabszym od otoczki.

Kwas 33% i  $1/10$  N. uszkodzają ziarna: pierwszy jest za mocny, drugi wymaga podniesionej temperatury w ciągu dłuższego czasu.

## 2. ODCZYNNIK DWUAZOWY.

Pauly ('04) wykazał, że ze wszystkich znanych produktów odbudowy białka tylko tyrozyna i histydyna reagują z odczynnikiem dwuazowym Ehrlicha ('83), tworząc w obecności alkali czerwone azozwiązki. Reakcję tę dają zarówno kwasy aminowe wolne, jak i w połączeniu białkowym.

Raciborski ('06) pierwszy zaproponował reakcję dwuazową, jako mikrochemiczną próbę na związki białkowe, zawierające aromatyczne aminy.

Ponieważ wiele ciał białkowych zawiera jednocześnie tyrozynę i histydynę, więc reakcja ta traci na wartości diagnostycznej. Inouye ('13) próbował zaradzić temu przez benzoilowanie, lecz dopiero Brunswikowi ('23) udało się przez zastosowanie reakcji ksantoproteinowej związać tyrozynę i dać możliwość histydynie, nie ulegającej nitrowaniu, wejścia w reakcję z odczynnikiem dwuazowym. Taka modyfikacja pozwala na wykrycie histydyny.

Reakcję wykonywał Brunswik na skrawkach ze świeżego materiału lub utrwalonych alkoholem dla lepszej lokalizacji w następujący sposób: Skrawki poddane działaniu 33%  $\text{HNO}_3$  i słabo ogrzane, następnie przemyte wodą, zadane stężonym roztworem sody, aż białko przyjmie zabarwienie pomarańczowo-żółte, traktuje się świeżo przygotowanym odczynnikiem dwuazowym według Pauly'ego ('04): 2 g kwasu sulfanilowego

zmieszać z 2 cc wody, dodać 2 cc kwasu solnego stęż. i ostrożnie wkraplać, przy ciągłym oziębianiu, roztwór 1 g azotynu sodu w 2 cc wody, osad zebrać, przemyć wodą, rozpuścić w roztworze sody. Odczynnik musi być bezbarwny, jest to kwas dwuazobenzolosulfonowy.

Raciborski ('06) przyrządza odczynnik dwuazowy z różnych aromatycznych amin, zaznaczając, że oprócz histydyny i tyrozyny inne aminy aromatyczne i fenole również dają tę reakcję.

Brunswick ('23) radzi potwierdzić chemiczną naturę badanego białka jeszcze innymi reakcjami, najlepszą jest do tego próba biuretowa, po tej reakcji i próbie z odczynnikiem dwuazowym, poprzedzonej nitrowaniem, można mówić o histydynie.

#### a) KW. DWUAZOBENZOLOSULFONOWY.

Bezpośrednio stosowany: powierzchnia ziaren skrobiowych, amyloplasty przy skrobi i amyloplasty, zawierające wewnątrz skrobię, barwią się na kolor wiśniowo-czerwony. Amyloplasty mają zabarwienie mocniejsze, powierzchnia ziarna skrobi słabsze i silniejsze na obwodzie ziarna. Reakcja wypada dobrze i na materiale nieutralnym.

Na przekroju przez ziarno (Tabl. II, rys. 5), w niewielu wypadkach, mogłam stwierdzić, że otoczka ziarna jest zabarwiona na różowo, zewnętrzny jej obwód jest mocniej zabarwiony na czerwono, wewnątrz ziarna jest bezbarwne, tylko miejscami posiada słabo różowo zabarwione sfery, tworzące jakby uwarstwienie ekscentryczne; warstw tych mogłam zauważyć tylko dwie. Następnie w tym miejscu, gdzie odgranicza się otoczka od wnętrza ziarna występuje pas, miejscami szerokości  $\frac{1}{3}$  otoczki, silnie zabarwiony na czerwono. A więc reakcja ta pozwoliła stwierdzić występowanie białka na obwodzie, w otoczce i we wnętrzu ziarna. Jednak w większości wypadków wewnątrz ziarna pozostawało bezbarwne.

b) KW. DWUAZOBEŃZOLOSULFONOWY PO NITROWANIU  
(po reakcji ksantoproteinowej).

Nie mogłam użyć kwasu 33% tak, jak podaje Brunswik, ponieważ niszczy skrobię. Używałam więc kwasu azotowego 20% i N/10, działając w ciągu dłuższego czasu, aby związać całkowicie tyrozynę. Po 2-godzinnym działaniu kwasu 20% i 5-godzinnym  $\frac{1}{10}$  N na utrwalonym przez alkohol preparacie, przemyciu wodą, badaniu w sodzie (amyloplasty i skrobia zabarwione na pomarańczowy kolor) i następnie po dodaniu odczynnika dwuazowego otrzymałam próbę na histydynę dodatnią: zabarwienie wystąpiło w amyloplastach i na ziarnie skrobi.

### 3. REAKCJA DWUAZOWANIA RACIBORSKIEGO.

Wykrycia i umiejscowienia aromatycznych amin i fenoli w tkance roślinnej dokonał Raciborski ('06) przy pomocy mikrochemicznie zastosowanych reakcji: dwuazowania i łączenia z aromatycznymi związkami dwuazowymi (reakcja poprzednia). Powstają silnie zabarwione amidoazo- i oksyazozwiązki.

Raciborski podaje następujący sposób wykonania reakcji: w trzech miseczkach znajdują się odczynniki. W pierwszej 10% roztwór azotynu sodu, drugiej 10% kw. siarkowy, trzeciej 10 — 20% roztwór sody; skrawki przeprowadza się kolejno przez te płyny, przytem trzeba uważać, aby w kwasie nie były dłużej, niż 1 minutę.

Kwas azotowy przeprowadza w komórce aminy aromatyczne w dwuazozwiązki, które w środowisku alkalicznym sprzęgają się ze sobą, dając barwiki. Raciborski zaznacza, że nie udało mu się tym sposobem wykazać tylko grupy tyrozyny przy jednoczesnym występowaniu fenoli.

Same amyloplasty i amyloplasty przy ziarnach skrobi, są silnie zabarwione na kolor wiśniowo-czerwony, powierzchnia zaś ziaren słabiej i wyraźniej tylko na obwodzie.

Przy pomocy tej reakcji otrzymuje się o wiele mocniejsze zabarwienie, niż z odczynnikiem dwuazowym.



#### 4. ODCZYNNIK MILLONA.

Millon ('49) używał roztworu rtęci w kwasie azotowym do makrochemicznego wykrycia białka i produktów jego rozpadu. Odczynnik ma działanie ze względu na obecność wolnego kwasu azotawego i wywołuje czerwone zabarwienie już na zimno. Czułość reakcji wynosi 1 : 20000 według Tunmanna (13 p. 411). Hoffmann ('63) podaje, że tyrozyna daje taką samą reakcję, a Vintschgau ('69) stwierdza zależność między odczynem ciał białkowych i tyroziną. Nasse ('79) tłumaczy ten odczyn występowaniem w cząsteczce białka pierścienia aromatycznego z grupą fenolową. Krasser ('87) zaś idzie dalej i mówi, że oprócz tyrozyny także aromatyczne oksykwasy i fenole dają tę samą reakcję, jak np. kw. salicylowy, oksymigdałowy, krezol, fenol. Wobec tego sam odczynnik Millona nie określa charakteru białka, lecz dopiero łącznie z innymi próbami. Pierwszy Hartig ('58) zaczął używać mikrochemicznie odczynnika Millona, zmieniawszy cokolwiek jego sposób przyrządzenia.

Ciekawe jest spostrzeżenie Millona, że reakcję z jego odczynnikiem dają nie tylko białka, produkty ich rozpadu, lecz także bawełna i skrobia barwią się na czerwono. Zjawiskiem tem zajął się Krasser i przypisuje je występowaniu w skrobi glutenu, a w bawełnie protoplazmy; a więc uzależnia wynik dodatni reakcji od obecności białka.

Ponieważ kwas azotowy w odczynniku Millona jest mocny, amyloplasty i ziarna skrobi ulegają szybkiemu zniszczeniu, zabarwienie, jakie się zjawia jest bardzo słabe i rozlane. Niema zatem umiejscowienia. Wobec tego musiałam użyć do mikrochemji skrobi rozcieńczonego odczynnika, używanego w makrochemji do oznaczeń ilościowych.

#### ODCZYNNIK MILLONA ROZCIĘNCZONY.

Weiss ('19) wprowadził do oznaczenia kolorymetrycznego białka roztwór 10% siarczanu rtęciowego w 5% kw. siarkowym i  $\frac{1}{2}$ % roztwór azotynu sodu. Roztwór białka po dodaniu obu płynów i ogrzaniu do wrzenia barwił się na czerwono.

Reakcję wykonałam w ten sposób, że do utrwalonego skrawka dodałam kroplę roztworu siarczanu rtęciowego i kroplę roztworu azotynu sodu, oba płyny w stężeniu podanem przez Weiss a.

Po  $1\frac{1}{2}$  godz. amyloplasty zaczynały się barwić, po  $1\frac{1}{2}$  godz. zabarwienie było silne, ceglasto-czerwone. Umiejscowienie zabarwienia jest bardzo dokładne, a więc w amyloplastach i na powierzchni ziarna skrobi; na skrawku przez ziarno skrobi widać zabarwioną obwódkę i znacznie słabiej otoczkę, wewnątrz zaś ziarna pozostaje bezbarwne.

*Odczynnik Millona w modyfikacji Weissa* daje lepszy efekt, niż roztwór rtęci w kwasie azotowym mocnym, ponieważ kw. siarkowy jest słaby, nie uszkadza więc skrobi i amyloplastów, w przeciągu bardzo długiego czasu, a niezbędny w tej reakcji kw. azotawy wytwarza się na miejscu. W celu przeszkodzenia ulatniania się kw. azotawego oprowadzałam brzegi szkiełka nakrywkowego waseliną.

Aby przekonać się, że rzeczywiście mam tu do czynienia z tyroziną, postąpiłam w ten sposób, że najpierw zastosowałam reakcję ksantoproteinową, a później *Millona*. Brunswik ('23) podaje, że nitrotyrozyna nie daje już reakcji z odczynnikiem *Millona*.

#### ODCZYNNIK MILLONA ROZCIĘNCZONY PO REAKCJI KSANTOPROTEINOWEJ.

Reakcję ksantoproteinową wykonałam z kw. azotowym 20%, który działał w ciągu 2 godz., aby całkowicie związać tyrozinę, potem przemyłam skrawek wodą, następnie roztworem sody, aby zneutralizować nadmiar kw. azotowego, który przeszkadza próbie *Millona* (lub osłabia ją), jak to zaznacza Brunswik ('11), wreszcie podzielałam rozcieńczonym odczynnikiem *Millona*, zmienionym przez *Weissa*. Ziarna skrobi i amyloplasty nie barwiły się, w ciągu 6 godz. Przeto wynik ujemny reakcji *Millona* po nitrowaniu dowodzi, że oprócz tyrozyny nie ma w amyloplastach i na powierzchni skrobi innych związków, zawierających pierścień fenolowy.

#### 5. KWAS ORTOFOSFOROWY.

Hunter ('23) użył kwasu ortofosforowego do wykrycia białka, a *Romieu* ('25) wprowadził go do mikrochemii roślin-

nej i zwierzęcej. R o m i e u umieszczał skrawki, utrwalone alkoholem lub formaliną, w kropli kw. ortofosforowego i ogrzewał do 52°. Białko daje zabarwienie czerwone, przechodzące w fioletowe. Reakcji tej nie daje tyrozyna i fenyloalanina, daje ją natomiast tryptofan. R o m i e u uważa reakcję z kwasem ortofosforowym za charakterystyczną dla heterocyklowych kw. aminowych.

Reakcję wykonywałam bez ogrzewania, prawie natychmiast amyloplasty barwią się silnie na różowo-fioletowo, powierzchnia zaś ziarna skrobi słabo, zato silnie jest zabarwiony ośrodek ziarna; na ziarnie przekrojonem zabarwienie występuje tylko na obwodzie otoczki ziarna.

Po kilkunastu minutach działania kw. ortofosforowego ziarno skrobi ulega destrukcji, początkowo zaznaczają się wyraźnie poszczególne warstwy i promieniowo, prostopadle do uwarstwienia, przebiegające trichity, obraz taki, jaki podał M e y e r <sup>1)</sup> dla nie naruszonego ziarna skrobi, a jaki bardzo rzadko można obserwować. Po kilku godzinach nie widać już wewnętrznej struktury ziarna, wewnątrz zostaje rozpuszczone, pozostają otoczki, które znikają po 24 godz. działania kwasu.

## 6. REAKCJA BIURETOWA.

Pierwsi R o s é ('33) i M i t s c h e r l i c h ('37), później J o n e s ('48) spostrzegli, że niektóre białka dają niebiesko-fioletowe zabarwienie z alkalicznym roztworem siarczanu miedziowego. H u m b e r t (p. 272) podaje: „...skoro białka jest więcej, zabarwienie występuje już na zimno, w innych zaś wypadkach dopiero po ogrzaniu”. P i o t r o w s k i ('57) zauważył, że odczynnik może być użyty mikrochemicznie i że węglowodany, tłuszcze i gliceryna nie dają tej próby. S a c h s ('59) zastosował reakcję biuretową mikrochemicznie w ten sposób, że na skrawki działał siarczanem miedziowym, a potem ługiem, powstawało zabarwienie fioletowe. W zależności od rodzaju białka B r ü c k e ('88) i R i t t h a u s e n ('68) otrzymywali zabarwienie

---

<sup>1)</sup> M e y e r A. ('95). Untersuchungen über die Stärkekörner p. 121. Taf. VII, Fig. 2.

od błękitno- do czerwono-fioletowego. Według Schiffa ('96) reakcję tę oprócz biuretu, dają produkty rozpadu białka, polipeptydy oraz białko, zawierające 2 grupy CONH w cząsteczce. Neumeister<sup>1)</sup> oznaczył czułość reakcji, wynosi ona dla białek 1 : 2000, jest więc mniej czuła, niż inne reakcje białkowe. Reakcję wykonywałam według przepisu podanego przez Tunmanna ('13 p. 414). Skrawki utrwalone alkohol. roztworem sublimatu przemycie od alkoholu, którego obecność przeszkadza wystąpieniu reakcji, pozostawiłam na  $1\frac{1}{2}$  godz. w stęż. wodnym roztworze siarczanu miedziowego, potem po przemyciu wodą dodałam 50% ługu potasowego.

Amyloplasty rozpuszczają się wolno, a ziarna skrobi nie pęcznieją dotąd, dopóki nie zostanie rozpuszczony amyloplast i otoczka białkowa, powlekająca ziarno skrobi. Z chwilą rozpuszczenia się ich ziarno gwałtownie pęcznieje. Duże ziarna skrobi, przy których niema amyloplastów, pęcznieją momentalnie, można więc przypuścić, że powłoka białkowa jest na nich bardzo cienka lub że jej już zupełnie brakuje. Czas rozpuszczania amyloplastu trwa około 10 minut. Amyloplasty duże, zawierające wewnątrz małe ziarna skrobi, trwają znacznie dłużej, przez kilka godzin, przytem można obserwować, jak ziarno skrobi w amyloplacie nieco pęcznieje, a szeroka obwódka amyloplastu zabarwia się na fiołkowo. Na powierzchni małych ziaren występuje słabsze, niż na amyloplacie, zabarwienie fioletowe, na dużych ziarnach zabarwienia nie spostrzegłam.

## 7. WANILINA Z KWASEM SOLNYM.

Odczynnik przyrządzono według Behrensa ('08).

Winckel ('05) używał waniliny z kw. solnym do mikrochemicznej próby na enzymy, lecz Rosenthaler ('07) i Tunmann ('09) stwierdzili, że reakcja ta zależy od tryptofanu, dają ją mianowicie białka, zawierające w cząsteczce grupę tryptofanową. Tunmann ('13 p. 415) barwił aleuron bezpośrednio przez włożenie skrawka do waniliny z kw. solnym i otrzymywał zabarwienie fiołkowe do czerwonego.

---

<sup>1)</sup> Tunmann ('13) p. 414.



Po bezpośrednim działaniu tego odczynnika amyloplasty barwią się na czerwono-fioletowo, a również powierzchnia ziarna skrobi; zabarwienie występuje już po kilku minutach; na przekroju przez ziarno widać otoczkę zabarwioną na różowo, przytem jej część zewnętrzna i wewnętrzna jest barwy czerwonej, wewnątrz ziarna pozostaje bezbarwne.

#### 8. $\alpha$ -NAFTOL I NaOCl — ODCZYNNIK SAKAGUCHI'EGO.

Shoyo Sakaguchi ('25) podaje, że arginina i związki białkowe, mające wolną grupę  $\text{HNC}(\text{NH}_2) \cdot (\text{NH})$  — kwas szeregu tłuszczowego, dają z alkalicznym roztworem  $\alpha$ -naftolu (0,1 w 100 cc  $\frac{1}{2}\%$  NaOH) i 1% podchlorynem sodu czerwone zabarwienie. Czułość tej reakcji dla argininy w kompleksie białkowym wynosi 1 : 50000.

Zastosowawszy mikrochemicznie *odczynnik Sakaguchi'ego* na skrawkach utrwalonych formaliną, otrzymałam czerwono-ceglaste zabarwienie występujące na amyloplastach i także same, lecz bardzo słabe na powierzchni ziaren. Na świeżych skrawkach niema lokalizacji, ponieważ amyloplast ulega pęcznieniu, rozpuszcza się i zabarwia się cała tkanka.

#### 9. REAKCJA AXENFELDA.

Axenfeld ('85) używał 0,1% roztworu chlorku złota do próby mikrochemicznej na białko<sup>1)</sup>. Białko zakwaszone kw. mrówkowym daje z chlorkiem złota czerwone zabarwienie. Charakterystyczne jest tylko czerwone zabarwienie, natomiast niebieskie i fioletowe zależy od obecności cukru gronowego, skrobi, glikogenu, leucyny, tyrozyny, kreatyny, kwasu moczowego i mocznika. Czułość reakcji jest bardzo duża, wynosi według Tunmanna ('13 p. 493) 1 : 2000000.

Do mikrochemji wprowadzili ten odczynnik Chmielewski<sup>2)</sup> i Tichomirow ('900) do barwienia kryształów

<sup>1)</sup> Literatura z pracy doktorskiej A. Ossowskiego ('27).

<sup>2)</sup> Strasburger E. ('13) p. 135, po raz pierwszy w wydaniu z roku 1897.

w ziarnach aleuronowych, używając silniejszych roztworów chlorku złota i wystawiając je na działanie światła po dodaniu kwasu mrówkowego, Strasburger ('13 p. 170) zaś barwi nim leukoplasty w długotrwałej metodzie w celu utrwalenia ich. Reakcję wykonałam według zmodyfikowanej przez Ossowskiego ('28) metody Chmielewskiego. Skrawki utrwalone poddawałam działaniu kwasu mrówkowego (10% roztwór w 50% alkoholu) w ciągu 15 minut, następnie kwas odsączyłam bibułą i pod szkiełko nakrywkowe dodałam kroplę 10% chlorku złota. Czerwone zabarwienie zjawiało się już w ciągu pół godziny, dogodniejsze więc okazało się używanie kw. mrówkowego przed chlorkiem złota, reakcja bowiem wypada szybciej.

Amyloplasty, a również i powierzchnia ziarna skrobi barwi się na mocno czerwony kolor, powierzchnia ziarna skrobi ma odcień lekko fioletowy, podczas gdy amyloplasty są czysto czerwone. Przekrój przez ziarno barwi się słabo, a więc na blado różowy kolor zabarwiona jest część wewnętrzna ziarna, sama otoczka pozostaje bezbarwna, tylko jej część obwodowa jest zabarwiona na czerwono.

## 10. NINHYDRYNA.

Ruhemann ('10) pierwszy spostrzegł, że białka, peptony i aminokwasy dają z ninhydriną (triketohydrindenhydratem) niebieskie zabarwienie. Abderhalden i Schmidt ('11) zbadali zachowanie się szeregu białek i kwasów aminowych względem ninhydryny. Okazało się, że próbę tę dają białka proste, peptony, polipeptydy, kw. aminowe przytem zabarwienie niebieskie zależy od wolnej grupy aminowej i karboksylowej. Odcień zabarwienia zależy od odczynu: jeśli jest słabo kwaśny, otrzymuje się zabarwienie niebieskie z odcieniem czerwonym, przy alkalicznym zabarwienie nie powstaje wcale, a przy obojętnym odczynie występuje często niebieska barwa.

Loew ('18) użył 1% roztworu do mikrochemii białka, przytem nie ogrzewał, jak jego poprzednicy, lecz zostawiał w temperaturze pokojowej. Najszybciej daje zabarwienie histydyna, leucyna, alanina, później lizyna i arginina, kw. aspara-

ginowy i glutaminowy po 2 godz., fenyloalanina po 3 godz., tyrozyna zaś nawet po 24 godz. nie daje zabarwienia.

Zabarwienie zjawiające się na skrawkach po 1—2 godz. wskazuje na różne kwasy aminowe, lecz nie na tyrozynę i argininę. Dłuższe działanie odczynnika w temperaturze pokojowej ma tę przewagę nad ogrzewaniem, że daje lepszą lokalizację.

Reakcję wykonywałam na skrawkach utrwalonych alkoholem, a również na świeżych, wynik był jednakowy: po godzinie występowało słabo niebieskie zabarwienie, po upływie 24 godzin natężenie zabarwienia wzrosło nieznacznie, zabarwione były tylko ziarna skrobi; po słabem ogrzaniu, niedoprowadzającym do klajstrowania skrobi, mniej więcej do 40° ziarna skrobi barwią się mocniej, szczególnie silnie zabarwiony jest ośrodek, natomiast amyloplasty b. słabo.

Reakcja ta pozwala jedynie stwierdzić występowanie białka lub produktów jego rozpadu: do peptonów i aminokwasów, nie jest jednak specyficzna na określony rodzaj białka. Z zachowania się amyloplastów i ziaren skrobi wobec ninhydryny mogę wnioskować, że na powierzchni ziarna skrobi, w pozostałej resztkę amyloplastu, występują kwasy aminowe w znaczniejszej ilości, niż w samym amyloplacie (słabsze zabarwienie). Ponieważ z poprzednimi odczynnikami na aminokwasy zabarwienie było silniejsze, niż w amyloplastach, więc z zachowania się wobec ninhydryny można sądzić, że na ziarnie skrobi jest więcej aminokwasów wolnych niż w amyloplacie.

Nie stosując ogrzewania lub ogrzewając słabo, nie przekraczając temp. 40°, udało mi się otrzymać wynik dodatni z ninhydryną i wykazać lokalizację podczas gdy Zwickler ('21 p. 76), klajstrując skrobię, otrzymał zielonawo zabarwiony flek i uznał reakcję tę za bardzo niepewną.

## 11. KWAS SOLNY ).

Białko zwierzęce (Bourdois i Cavenlou ('28)) i białko roślinne (Vauquelin ('28), Runge ('28) Bonastre) daje z kw. solnym czerwone zabarwienie. Reakcje

1) Literatura i bliższe szczegóły w pracy A. Ossowskiego, p. 29—30.

tę zbadał Mulder ('40) i Ritthausen ('72), który otrzymywał z białkiem roślinnym zabarwienie brunatno-fioletowe, Krasser ('86 p. 123) wyjaśnił, że tworzenie się czerwonego zabarwienia zależy od temperatury (poniżej 7° nie zjawia się) i od ilości kwasu. Mesnard ('93) użył kw. solnego mikrochemicznie w ten sposób, że działał parami kwasu na skrawek umieszczony w wiszącej kropli. Według Tunnanna ('13 p. 416) czerwone zabarwienie zależy od tryptofanu, występującego w cząsteczce białka, przytem kwas solny, działając nawet w ciągu 24 godz., może nie wywołać zabarwienia, które powstaje dopiero po ogrzaniu, to samo podaje i Correns ('94).

Reakcję wykonałam według metody Mesnarda. Utrwalone skrawki w kropli stężonego roztworu cukru w glicerynie trzymałam nad otwartym naczyniem ze stęż. kw. solnym. Po 10 min. obserwowałam skrawki pod mikroskopem: ziarna skrobi miały bardzo słabo różowo zabarwioną obwódkę, amyloplasty zaś nie wykazywały zabarwienia. Przy dłuższym działaniu par HCL ziarna skrobi podlegają pęcznieniu i rozpływają się, niemożliwością było przeto ułoić w takich ziarnach jakiegokolwiek zabarwienie, temsamem zostało wykluczone również i ogrzewanie.

Próbowałam użyć krzemianu, który w środowisku kwaśnem tworzy galaretowatą powłokę i przez to ochrania przed zbyt szybkim i szkodliwym działaniem kw. solnego lecz wynik był taki, jak i przy metodzie Mesnarda. Membrany krzemowej używał Kretz ('22) do reakcji na białko z odczynnikami, w skład których wchodziły mocne kwasy.

## 12. REAKCJA CHINONOWA RACIBORSKIEGO.

Powyższą reakcję dają białka, peptony i aminokwasy<sup>1)</sup>. W tych wypadkach, gdy reakcje Millona i biuretowa wypadają ujemnie lub b. słabo, Raciborski uważa, że po dodatnim wyniku reakcji chinonowej można myśleć o obecności kwasów aminowych szeregu tłuszczowego, glikokolu, alaniny, leucyny, argininy, kw. asparaginowego, asparaginy i kw. glutaminowego.

Do tej reakcji użyłam świeżo przyrządzonego stęż. wodnego roztworu chinonu. Czerwone zabarwienie wystą-

<sup>1)</sup> Raciborski M. ('06) p. 554, 556.



piło w całej komórce, niema umiejscowienia, zarówno w skrawkach świeżych, jak i utrwalonych.

### 13. ALOKSAN.

Krasser ('86 p. 135) wprowadził aloksan do mikrochemji. Białka i produkty rozpadu, jak tyrozyna, kw. asparaginowy, asparagina dają zabarwienie purpurowo-czerwone. Reakcja zależy od występowania w białku grupy  $\text{CH}_2 \cdot \text{CH} \cdot (\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ . Białka in substantia dają łatwiej zabarwienie, niż białko w roztworze. Krasser ('86) używał stężonych roztworów wodnych i alkoholowych na zimno a Ossowski ('27 p. 26) stosował słabe podgrzewanie na łożni elektrycznej, dzięki czemu można było użyć roztworów rozcieńczonych i uniknąć niepożądanej krystalizacji odczynnika przy obserwacji.

Reakcja ta wypadła na materiale utrwalonym bardzo słabo: zarówno ziarna skrobi, jak i amyloplasty barwiły się nieznacznie.

Badanie moje zgadza się do pewnego stopnia z wynikiem Zwickera ('21 p. 76), który z tym odczynnikiem nie otrzymał zabarwienia na ziarnach skrobi.

Pominięłam reakcje, używane przez wielu autorów w mikrochemji roślinnej, polegające na barwieniu białka *roztworem jodu, barwikami, kwasem fosfomolibdenowym*, jak również *reakcję Zachariasza* i inne, ponieważ one mają na celu tylko wykazanie białka bez wnikania w jego charakter chemiczny. *Reakcje Adamkiewicza i Voissenet'a* na tryptofan okazały się niedogodne w użyciu, a także reakcja *Raspail'a* nie mogła być wykonana na skutek rozptywania się substancji amyloplastów. Również *reakcja Molischa*:  $\alpha$ -naftol (tymol) i kw. siarkowy na glukoproteidy okazała się nieodpowiednią z tego samego powodu.

Ponieważ szereg reakcyj jest wspólnych dla wielu aminokwasów, więc ułożenie jednych i drugich w postaci tabliczki pozwoli zorjentować się, jakie aminokwasy znajdują się w obiektach badanych przeze mnie.

## WYNIK BADANIA NA BIAŁKO I AMINOKWASY.

ODCZYNNIK	Ziarno Skrobi	Amyloplast.	Tyrozyna	Histydyna	Tryptofan	Arginina	Asparagina, kw. asparaginowy	Cystyna
Reak. Ksantoproteinowa	+	+	+		+			
Odcz. Dwuazowy Pauly'ego	+	+	+	+				
Odcz. Dwuazowy po reak. ksantoproteinowej	+	+		+				
Reak. Dwuazowania Raciborskiego	+	+	+	+				
Odcz. Millona	+	+	+					
Odcz. Millona po reak. ksantoproteinowej	—	—	+					
Kwas ortofosforowy	+	+			+			
Reak. biuretowa	±	+	Białka i produkty rozpadu					
Wanilina + HCL	+	+			+			
Odcz. Shoyo Sakaguchi'ego	±	+				+		
Odcz. Axenfelda	+	+	Białka					
Ninhydryna	+	±	Białko i produkty rozpadu białka					
HCL stęż. (pary)	±	—			+			
Reak. chinonowa Raciborskiego	—	—	Białko i produkty rozpadu białka, gdy Millon i buret, ujemne, to dają arginina, asparagina, kwas asparaginowy, glutaminowy, leucyna			—	—	
Aloksan	±	±	+				+	
Próba Kleina na siarkę	+	+						+

Występowanie białka i produktów jego rozpadu wykazały reakcje ogólne: *biuretowa*, *Axenfelda* i *ninhydrynowa*.

W białku amyloplastów i na powierzchni ziarna skrobi stwierdziłam następujące aminokwasy:

TYROZYNĘ wykryłam odczynnikiem *Millona*, zastosowawszy go bezpośrednio i po nitrowaniu.

HISTYDYNĘ stwierdziłam z zachowania się odczynnika dwuazowego po reakcji *ksatoproteinowej*.

TRYPTOFAN wykazały reakcje: z *kw. ortofosforowym*, *waniliną w kw. solnym* i z *parami kw. solnego*.

ARGININĘ wykryłam odczynnikiem *Sakaguchi*'ego.

NA ASPARAGINĘ, KW. ASPARAGINOWY I GLUTAMINOWY wskazuje reakcja *Krassera* z aloksanem i ninhydryną. Reakcja chinonowa wypadła ujemnie, więc nie może potwierdzić obecności argininy, asparaginy i kw. asparaginowego, chociaż byłoby to niemożliwe i przy dodatnim wyniku, ponieważ warunkiem dla stwierdzenia tych aminokwasów muszą być ujemne reakcje *Millona* i *biuretowa*, co znowu jest niemożliwe ze względu na obecność tyrozyny i histydyny.

Do reakcyj na białko trzeba zaliczyć i badania na siarkę, ponieważ wykryłam ją w związku organicznym, w skrobi może występować tylko łącznie z białkiem, a więc składnikiem, zawierającym siarkę, jest prawdopodobnie <sup>1)</sup> CYSTYNA.

Obecność niektórych, wykrytych przeze mnie w amyloplastach i skrobi, kwasów aminowych była stwierdzona makrochemicznie w bulwach ziemniaka, np. *Sjollem* i *Rinkes* <sup>2)</sup> znaleźli w bulwach 4,2% argininy a 2,3% histydyny.

Co się tyczy rozmieszczenia białka, to w samym ziarnie skrobi mogłam stwierdzić, że reakcja na białko wypadła dodatnio z większością odczynników tylko na obwodzie otoczki ziarna, sama zaś otoczka i wewnątrz ziarna pozostało bezbarwne. Jednak przy reakcji *Axenfelda*, najbardziej czulej, gdyż pozwalającej wykryć białko w rozcieńczeniu 1 : 2000000, otrzymałam słabe zabarwienie z treścią wewnętrzną.

<sup>1)</sup> Mörner ('14).

<sup>2)</sup> Guggenheim ('24).

na ziarna, również kw. azotowy wykazał obecność białka w stromie wewnętrznej ziarna, natomiast waniлина w kw. solnym pozwoliła stwierdzić, że białko występuje w większej ilości nie tylko na obwodzie otoczki, lecz wycieła ją grubszą warstwą od wewnątrz, i w mniejszej już ilości równomiernie przepaja całą otoczkę.

Z zachowania się odczynnika dwuazowego można sądzić, że białko występuje pasami wewnątrz ziarna tak, jak przebiegają słoje i że jest to reszta znajdującego się uprzednio w tym miejscu amyloplasty.

Oprócz tych reakcyj wypadła dodatnio reakcja krystaliczna na siarkę, przytem rozmieszczenie kryształów pokrywa się z wynikami, otrzymanymi przy reakcjach barwnych, a więc siarka, znajduje się na powierzchni, w otoczce i wnętrzu ziarna.

Sumując wyniki reakcyj białkowych, które były stosowane na całych ziarnach i przekrojach przez nie, mogłam stwierdzić, że reakcje białkowe wypadają na ziarnach słabiej, niż na amyloplastach, lecz wykazują obecność tych samych składników w obu jednostkach morfologicznych, a więc tyrozyna, histydyna, tryptofan, arginina, a prawdopodobnie kw. asparaginowy, asparagina i kw. glutaminowy występują w amyloplastach i na ziarnach skrobi, oprócz tego na ziarnach znajduje się więcej produktów rozpadu ciał białkowych, niż w amyloplastach; nadto ośrodek ziarna skrobi zawiera więcej białka niż cienka warstwa powlekająca ziarna i wreszcie, że białko występuje wewnątrz ziarna w bardzo małej ilości, w cokolwiek większej w otoczce i dlatego nie można otrzymać dodatniego wyniku z większością odczynników, ponieważ reakcja wypada tylko z temi, które są bardziej czułe.



## P R O T E I D Y.

## 1. FOSFOPROTEIDY.

Należą do złożonych białek, dających zarówno reakcje na białko, jak i na fosfor. Reakcja na fosfor nie dała jego umiejscowienia, nie mogłam więc stwierdzić, gdzie występuje w większej ilości: wewnątrz ziarna, czy na obwodzie, wobec tego wykazanie połączenia kwasu fosforowego z białkiem było niemożliwe, ponieważ występujące wewnątrz ziarna kationy dają związek z kwasem amylofosforowym.

## 2. GLUKOPROTEIDY.

Glukoproteidy są złożonymi białkami, w cząsteczce których białko jest połączone z węglowodanem, albo pewną grupą, do której wchodzi węglowodany. Zawierają one mniej azotu i węgla, zato więcej tlenu i siarki, co zaś się tyczy własności chemicznych, to dają reakcje barwne na białko i reakcje na węglowodany. Przytem reakcje na węglowodany wypadają znacznie później, niż na cukry wolne, na co wskazuje Molisch ('24 p. 130), używając do tego celu  $\alpha$  — naftolu i  $H_2SO_4$ st.

Niektóre glukoproteidy, jak dotąd stwierdzono, dają przy hydrolizie glukozaminę, w innych natura występującego węglowodanu nie została jeszcze zbadana.

Wykazałam część białkową glukoproteidu w poprzednim dziale, obecnie zajmę się stwierdzeniem występowania węglowodanów związanych.

## 2. C U K R Y.

Reakcje na cukry przerabiałam na skrawkach świeżych i przemytych wodą. W pierwszym wypadku wykrywałam ogólną ilość cukru, w drugim tylko cukier związany. Wolne cukry usuwałam w ten sposób, że skrawki po utrwaleniu alkoholem przemywałam strumieniem wody w ciągu 48 godzin. Po tym czasie skrawki nie zawierały, już zupełnie wolnego cukru.

## 1. REDUKCJA SOLI MIEDZI.

a) *Używałam roztworu Fehlinga* ('64) przyrządzonego według Classena ('06). Odczynnik ten wprowadził do mi-

krochemji Schimper<sup>1)</sup>). Reakcję wykonałam w następujący sposób: do kropli świeżo zmieszanych dwóch roztworów Fehlinga włożyłam skrawek i słabo podgrzałam, skrobia uległa napęcznieniu, uwidoczniła się otoczka, w której strącił się tlenek miedziawy w postaci czerwonych ziarenek. W małych amyloplastach, które siedzą przy ziarnach w formie czapeczki, wytrąca się zwykle 1 — 2 ziarenka, w dużych zaś zawierających wewnątrz małe ziarno skrobi, ilość ziarenek tlenu jest znacznie większa. Obraz taki otrzymałam zarówno na skrawkach świeżych, jak i utrwalonych. Rysunek 7 na tablicy II przedstawia ziarno skrobi z amyloplastem, po usunięciu wolnych cukrów, w odczynniku Fehlinga. Szybkość tworzenia się tlenu miedziawego na ziarnach skrobi jest mniejsza w skrawkach przemysłowych.

b) *Reakcja Flückigera* ('85) ze stałym winianem miedziowym i 15% wodorotlenkiem sodowym<sup>2)</sup> dała po ogrzaniu czerwony strąk w amyloplastach i na powierzchni skrobi. Na zimno nie tworzy się osad tlenu miedziawego, powstaje tylko słabe czerwone zabarwienie, wobec tego nie mogę tej próby uważać za dodatnią. Zachowanie się ziaren skrobi i amyloplastów względem odcz. Flückigera wskazuje na występowanie cukrów redukujących z wyjątkiem fruktozy, albowiem według Flückigera fruktoza daje reakcję już na zimno, glukoza dopiero po ogrzaniu.

Po stwierdzeniu występowania cukrów redukujących w amyloplacie i na powierzchni skrobi w skrawkach, z których został usunięty wolny cukier przechodzę do bliższej analizy poszczególnych cukrów.

c) *Próba Barfoeda na glukozę.*

Barfoed ('73) przyrządza roztwór 13,3 g octanu miedzi w 200 cc kw. octowego 1%. Taki roztwór w obecności glukozy redukuje się do tlenu miedziawego po ogrzaniu. Reakcja ta pozwala na wykrycie glukozy obok maltozy, gdyż daje ją tylko glukoza<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Strasburger A. ('13), p. 182.

<sup>2)</sup> Sposób przyrządzenia odczynnika i wykonania reakcji ob. A. Ossowski (p. 32).

<sup>3)</sup> Lippmann ('04).

Gdy jest mało strątu, to może on z czasem ulec utlenieniu i przejść do roztworu<sup>1)</sup>).

Próbe tę wykonywałam w ten sam sposób, co i poprzednie, na skrawkach, z których cukier rozpuszczalny został usunięty i otrzymałam po słabem ogrzaniu, czerwony strą w amyloplastach.

Tunmann ('13, p. 185) uważa, że reakcja ta musi ustać miejsca reakcji Flückigera, dającej lepszą lokalizację. Roztwór Fehlinga redukuje glukozę, fruktozę, maltozę i inne substancje organiczne, nie będące węglowodanami, odczynnik zaś Barfoeda ulega redukcji przez glukozę i takie substancje, jak chinon i rezorcyna, a które znowu nie występują w ziemniaku.

Reakcja ta pozwoliła mi stwierdzić obecność glukozy przy jednoczesnem występowaniu maltozy w amyloplastach.

### 3. REAKCJA AGOSTINI'EGO NA GLUKOZĘ.

Agostini ('87) użył do makrochemicznej próby na glukozę roztworu chlorku złota 1 : 1000 i roztworu wodorotlenku potasowego 1 : 20; po ogrzaniu do wrzenia i ostudzeniu, otrzymuje on zabarwienie fioletowe. Czułość reakcji 1 : 10000.

Próbe tę zastosowałam mikrochemicznie, biorąc 1 kroplę roztworu chlorku złota i kroplę wodorotlenku i ogrzewając w tej mieszaninie świeży skrawek. Amyloplasty barwią się na czerwono-fioletowo. Po silniejszym ogrzaniu skrobia klajstruje się i dopiero wtedy występuje zabarwienie w soku komórkowym. Na skrawkach przemytych od wolnych cukrów, reakcja w amyloplastach wypada słabiej. Reakcja ta w obecności ciał białkowych jest o tyle niepewna, że białka redukują chlorek złota w roztworze kwaśnym (reakcja Axenfelda).

### 4. PRÓBA Z FENYLOHYDRAZYNĄ.

Senft ('04) zastosował mikrochemicznie próbe na cukry Fischera ('90), który otrzymywał z fenylohydrazyną w roztworze kw. octowego, po ogrzaniu, krystaliczne żółte osazony.

<sup>1)</sup> Strasburger ('13), Reg. IV, p. 713.

Senft używa chlorowodorku fenylohydrazyny w roztworze glicerynowym (1 : 10) i octanu sodu w takim samym roztworze. Oba roztwory przechowuje oddzielnie, przy wykonywaniu reakcji bierze po 1 kropli każdego roztworu, miesza i wkłada skrawek. Na zimno wypadają kryształy po kilku godzinach osazonu fruktozy, najwcześniej po 24 godz. a kryształy osazonu glukozy, często dopiero po kilku dniach. Osazon fruktozy i glukozy kryształizuje w postaci igieł, zebranych w sferyty, pęczki, również występują i bezpostaciowe ziarenka.

Maltoza daje osazon dopiero po ogrzaniu na kąpieli wodnej w ciągu 1 godziny tworzą się z początku żółte, syropowate krople, z których często po kilku tygodniach wypadają kryształy cytrynowo - żółte, gdy kryształy glukozy i fruktozy są złoto-żółte. Oprócz trudno uchwytniej różnicy w zabarwieniu istnieje różnica w formie kryształów: są one blaszkowate i większe, niż delikatne i ostro zakończone kryształy glukozy i fruktozy, tworzące gwiazdki, albo grube, zbite masy, jak podaje Mangham ('11). Grimbert ('03) i Euler ('08) zbadali własności obu osazonów, które tak się przedstawiają: *fenyloglukosazon* różni się od *fenylomaltozazonu* rozpuszczalnością w mieszaninie równych części acetonu i wody, osazon maltozy rozpuszcza się, a glukozy nie.

#### a) Reakcja na zimno.

*Skrawki świeże.* Po dwóch dniach amyloplasty są wyraźnie zabarwione na żółto, lecz kryształy występują dopiero po 4-ch dniach. Po tygodniu i dłużej kryształy są lepiej wykształcone, kryształy o końcach ostrych i o brzegach ściętych, tafelkowate. Oprócz amyloplastów również i ziarna skrobi posiadają kryształy, przytem mniejsze ziarna mają kryształów więcej, niż duże, badanie rozpuszczalności kryształów wykazało glukozę.

*Skrawki utrwalone i przemyte.* Po kilku dniach i tygodniach na powierzchni ziaren krystalizuje glukosazon, którego kryształy występują w amyloplastach, i bardzo mało na powierzchni skrobi, a więc glukoza związana jest głównie w amyloplacie, na powierzchni ziarna jest jej bardzo mało.



## b) Reakcja po ogrzaniu.

Ogrzewałam preparaty w ciągu dłuższego czasu w cieplarni w temperaturze 40 — 50°. Po 2 $\frac{1}{2}$  godz. zjawiała się nieznaczna ilość kryształów na preparatach świeżych, po ostygnięciu preparatu i dłuższym czasie (po 12 godzinach) ilość kryształów zwiększała się. Kryształy umiejscowione były w amyloplastach i na powierzchni niektórych ziaren. Kryształy tworzą się takie same, jak i na zimno.

Przy badaniu rozpuszczalności kryształów, okazało się, że mieszanina acetonu z wodą (1 : 1) rozpuszcza tylko część kryształów, a więc dowodzi to, że występował tu glukosazon i maltosazon, pierwszy pozostał, a drugi uległ rozpuszczeniu. Na skrawkach utrwalonych i przemytych również występowały kryształy osazonu w amyloplastach i na skrobi, lecz po zbadaniu rozpuszczalności okazało się, że w amyloplacie była glukoza i maltoza, na skrobi zaś tylko glukoza. Tabl. II, rys. 8, a, b, b', d.

Ponieważ odczynnik działa w ciągu dłuższego czasu i stosowane jest ogrzewanie, można byłoby przypuścić, że pod wpływem uwalniającego się z odczynnika kw. octowego zachodzi hydroliza skrobi i stąd uwalniają się cukry a nie z glukoproteidu. Jednakże próba kontrolna wykazała, że skrobia poddana działaniu kw. octowego o stężeniu odpowiadającym temu, jakie znajduje się w odcz. fenylohydrazyna + octan sodu, w ciągu tego samego czasu i w tych samych warunkach, zachowuje się względem odcz. Fehlinga tak samo, jak i skrobia nie poddana działaniu kwasu lub ogrzewana z kwasem.

Przy pomocy reakcji z fenylohydrazyną stwierdziłam występowanie wolnej glukozy i maltozy w amyloplastach i na powierzchni ziaren skrobi, a związanej maltozy tylko w amyloplacie. Biorąc pod uwagę ilość kryształów, które ulegają rozpuszczeniu, przypuszczam, że maltozy występuje więcej, niż glukozy.

## 5. REAKCJA Z AMONJAKIEM NA MALTOZĘ.

Wöhlk<sup>1)</sup> otrzymywał ceglasto-czerwone zabarwienie, ogrzewając maltozę z 10% amonjakiem na kąpieli wodnej w ciągu

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler ('24).

15—20 minut. Przy ogrzewaniu należy unikać zagotowania się płynu. Reakcję tę daje jeszcze cukier mleczny, lecz glukoza nie. Reakcję Wöhlka zastosowałam mikrochemicznie: skrawek w 10% amonjaku ogrzewałam do 40° w naczynku z przykryciem, potem badałam w tym samym amonjaku na szkiełku przedmiotowym. Amyloplasty zabarwione na czerwono, na powierzchni ziaren skrobi zabarwienia nie widać. Ten sam obraz otrzymałam przez trzymanie skrawka w ciągu 24 godzin w kropli wody nad parami amonjaku. Reakcja wypadła dodatnio zarówno na skrawkach świeżych, jak i utrwalonych i przemytych. Reakcja ta potwierdza występowanie związanej maltozy w amyloplastach.

### *Wynik badania na cukry.*

Redukcja soli miedzi wykazała obecność cukrów redukujących, związanych w amyloplacie i na powierzchni skrobi. Ponieważ odczynnik Flückigera bez ogrzewania nie uległ redukcji, więc niema fruktozy, natomiast próba Barfoeda wskazuje na glukozę.

Ponieważ reakcje z orcyną w kw. solnym<sup>1)</sup>, z floroglucyną z kw. solnym<sup>2)</sup>, naftolem i kw. siarkowym<sup>3)</sup> na pentozy i kw. glukuronowy wypadły ujemnie, więc reakcję z fenylohydrazyną mogły dać tylko heksozy i maltoza. Za związanymi cukrami przemawia szybkość reakcji, z jaką odbywa się formowanie  $\text{Cu}_2\text{O}$ , po usunięciu cukrów rozpuszczalnych, redukcja zachodzi wolniej, trzeba dłużej ogrzewać preparat.

Po analizie cukrów redukujących, badając rozpuszczalność fenylosazonów, stwierdziłam, że glukoza występuje w stanie związanym w amyloplacie i w mniejszej ilości na ziarnie skrobi, a maltoza związana jest tylko w amyloplacie, na powierzchni skrobi występuje w stanie wolnym i jest jej tu bardzo mało.

Z tego wynika, że amyloplast podobnie, jak elajoplast i sekretogen jest glukoproteidem,

<sup>1)</sup> Allen u. Tollens ('90).

<sup>2)</sup> Tollens u. Mitarbeiter ('89).

<sup>3)</sup> Goldschmiedt ('10).

gdyż zawiera białko i związany z niem cukier: glukozę i maltozę, i że na powierzchni ziarna skrobi jest powłoka z glukoproteidu, w skład którego wchodzi glukoza.

### 3. LIPOIDY.

#### a) OLEJE (TŁUSZCZE).

Według Czapka ('13 p. 709) lipoidy obejmują: oleje, lecytydy, cerebrosydy, fitosteryny, woskowate substancje i chromolipoidy. Oznaczeniem lipoidów (specjalnie fosfatydów) w mące ziemniaczanej zajmował się Hiestand, a obecnie Rewald ('29) zbadał ich zawartość w całej bulwie.

Ze względu na najlepiej opracowane mikrochemiczne reakcje zwróciłam uwagę jedynie na oleje i fitosteryny. Celem wykrycia oleju w komórce roślinnej Czapek ('19) zastosował specjalny roztwór sudanu III, jako rozpuszczalnika użył on mocniejszego pirydynowego roztworu wodzianu amyleny; taki rozpuszczalnik, jak się okazało, wydziela olej w formie drobnych kropelek, uniemożliwiając ich dyfuzję, oraz nie zmienia wewnętrznej budowy komórki.

Sposób przygotowania odczynnika jest następujący: 8 cz. wody + 2 cz. wodzianu amyleny + 1 cz. pirydyny, po wyklarowaniu wlewa się do rurki z sudanem III suchym, wstrząsa dobrze i zostawia na 1 godzinę w temperaturze pokojowej, potem sączy i przechowuje w naczyniu szczelnie zamkniętym. Odczynnik utrzymuje się tydzień czasu.

Badania preparatu dokonywa w ten sposób, że świeże skrawki, uwolnione od wody, umieszcza na 1 godzinę w roztworze AP sudanu w naczyniu szczelnie zamkniętym, potem wkłada preparaty na minutę do wody destylowanej w celu wymycia wodzianu amyleny i następnie obserwuje w glicerynie: oleje barwią się na czerwono. Tą metodą wykrył Czapek krople oleiste w plazmie komórek mięksiszowych bulwy ziemniaczanej.

Taki roztwór sudanu III barwi lepiej olej, niż roztwór alkoholowy, wprowadzony do mikrochemji przez Buscalioniego ('98), oraz roztwór sudanu III (0,1 : 20,0) w kwasie mlekowym polecony przez S. Wiśloucha.

1. W ODCZYNNIKU CZAPKA amyloplasty i powierzchnia ziaren skrobi, szczególnie na samym obwodzie, barwią się na czerwono. AP Sudan daje zabarwienie, podczas gdy roztwór alkoholowy sudanu III nie wykazywał zabarwienia.

## 2. REAKCJA ZMYDLENIA MOLISCHA.

Molisch ('91) użył mieszaniny równych objętości stęż. roztworu wodorotlenku potasowego i 20% amonjaku, a Tunnann ('12) określił czas działania mieszaniny zmydlającej najmniej 1—2 dni. Produkt zmydlenia krystalizuje w postaci igieł. Jest to właściwa reakcja na oleje, gdyż tylko one ulegają zmydleniu.

Skrawek wysuszony na szkiełku przedmiotowym traktując odczynnikiem Molischa i po przykryciu szkiełkiem nakrywkowym zostawiam w wilgotnej kamerze. Po 48 godzinach występują drobne igiełki, które świecą w świetle spolaryzowanym. Umieszczenia niema żadnego, skrobia i amyloplasty uległy zupełnemu zniszczeniu pod wpływem działania mocnego ługu. Wobec tego, że Czapek ('19) znalazł w bulwie ziemniaka olej w postaci wolnych kropelek, nie można uważać igieł, otrzymanych przy zmydleniu za olej pochodzenia li tylko amyloplastowego i skrobiowego. Bądź co bądź można przyjąć, że reakcja zmydlenia Molischa wykazała obecność oleju, a odczynnik Czapka umożliwił umiejscowienie jego w amyloplastach i na powierzchni ziarna skrobi.

## b) FITOSTERYNA.

### REAKCJA Z DIGITONINĄ.

Brunswik ('22) wprowadził do mikrochemji digitoninę, jako grupowy odczynnik na fitosterynę i cholesterynę, opierając się na badaniach Windausa ('09 p. 49), który otrzymywał trudno rozpuszczalny krystaliczny digitonino-cholesteryd przy ilościowym oznaczeniu cholesteryny alkoholowym roztworem digitoniny (1% w 90% alkoholu). Czułość reakcji duża, kropla



0,00016% roztworu cholesteryny daje w ciągu 2 minut połączenia cholesteryny z digitoniną w formie igieł.

Brunswik uważa tę reakcję za najczulszą na fitosterynę i cholesterynę, przytem o tyle wygodną, że nie uszkadza skrawka tak, jak reakcje barwne na fitosterynę i cholesterynę z kwasem siarkowym i różnemi dodatkami [Liebermann ('85)].

Kryształy związku czy to fitosteryny, czy cholesteryny. przedstawiają się w postaci długich, cienkich igieł, często układających się w pęczki i sferyty, skoro stężenie steryn jest silniejsze. Aby otrzymać lepszy wynik, radzi Brunswik skrawek odvodnić.

Związek fitosteryny z digitoniną nie rozpuszcza się w wodzie, acetonie, eterze, bardzo trudno w zimnym 85—96% alkoholu, łatwo w gorącym absolutnym alkoholu, alkoholu metylowym, kwasie octowym lodowatym i pirydynie.

Reakcję wykonywałam na skrawkach świeżych, które zostały pozbawione wody przez pozostawienie skrawka na szkiełku przedmiotowym na powietrzu. Używałam odczynnika przygotowanego według przepisu Windausa. Kryształy tworzyły się w przeciągu 10—15 minut i występowały w dużej ilości na powierzchni skrobi i wychodziły z amyloplastów. (Por. Tablica II rys. 6 ziarna a i b).

Zachowanie się kryształów względem rozpuszczalników jest inne, mianowicie wszystkie kryształy nie rozpuszczają się w wodzie i alkoholu metylowym, a tylko część ich rozpuszcza się w kwasie octowym lodowatym, te, których kwas nie rozpuszcza, rozpuszcza pirydyna. Jeżeli preparat zostawić do drugiego dnia, to utworzone igły nie rozpuszczą się ani w kw. octowym lodowatym, ani pirydynie.

Występują tu więc steryny, różniące się własnościami swego digitonino-fitosterydu od innych fitosteryn. Że fitosteryny w zależności od rośliny, a nawet organu tej samej rośliny, mogą być różnorodne, zwrócili już na to uwagę Lippmann ('87) i Zappek ('13 p. 796).

Prawdopodobnem jest, że fitosteryny, jak i białko, wchodzące w skład amyloplastów, są swoiste dla bulwy ziemniaczanej.

## 4. ENZYMY.

## I. OKSYDAZY I PEROKSYDAZY.

## 1. BENZYDYNA.

Ze wszystkich metod używanych w mikrochemji do stwierdzenia obecności peroxydaz najlepsza jest reakcja z benzydynam, ponieważ daje produkt krystaliczny o ścisłej lokalizacji.

Reakcję tę wprowadził do mikrochemji Raciborski ('05), używając alkoholowo-wodnego roztworu benzydyny z dodatkiem dwutlenku wodoru.

Użyłam odczynnika przyrządzonego według przepisu Raciborskiego z dodatkiem kw. octowego, który zwiększa szybkość i natężenie reakcji, co spostrzegła Gertruda Woker ('17). Szczegółowy opis przyrządzenia odczynnika podaje Ossowski ('27 p. 35). Pod wpływem peroksydaz tworzy się z benzydyny błękit benzydynowy, który krystalizuje w postaci długich ciemno-niebieskich igieł.

Reakcję wykonałam na skrawkach utrwalonych alkoholem (utrwalenie trwało krótko, aby nie zniszczyć enzymów). Z początku amyloplasty i ziarna skrobi barwiły się na niebiesko, później, po 5 min. zaczynały tworzyć się kryształy. Mniej więcej po  $\frac{1}{2}$  godz., gdy kryształy były dobrze wykształcone, mogłam stwierdzić umiejscowienie peroksydaz w amyloplastach i na ziarnach skrobi. Duże ziarna skrobiowe wykazują często tylko niebieskie zabarwienie, nie dochodzi do powstawania igieł, natomiast na ziarnach skrobi, wytwarzanych przez amyloplast, tworzy się dużo kryształów błękitu benzydyny (C na rys. 1, Tabl. III), wskazywałoby to na większą ilość enzymów w stromie amyloplastów wytwarzających ziarna. Tabl. III rys 1 przedstawia: a — ziarno z amyloplastem, z którego wychodzi kryształ błękitu benzydyny, b — ziarno skrobi z zabarwionym na niebiesko amyloplastem, c — amyloplast wytwarzający drugie ziarno skrobi, na którym występuje duża ilość kryształów, d — ziarno skrobi z kryształami.

## 2. PYROGALOL.

Chodat ('10) i Bach ('03) używali pyrogalolu do wykazania oksydaz. Bach ('12) uważa tę reakcję za charakte-

rystyczną dla fenolazy, która działa utleniająco, w obecności wody utlenionej tworzą się czerwono-brunatne kryształy purpurogalliny i produkt rozpuszczalny w wodzie o tem samym zabarwieniu.

Używałam odczynnika złożonego z 1 cz. roztworu 10% pyrogalolu i 1 cz. dwutlenku wodoru 1%. Kryształy tworzą się w amyloplastach i na powierzchni ziaren skrobi.

Obecnie zamiast metody pyrogalolowej Chodat'a, E v a r d ('28 p. 9) używa przy badaniu oksydaz metody błękitu krezolowego tegoż autora.

### 3. NALEWKA GWAJAKOWA.

G r ü s s ('95) użył reakcji z roztworem żywicy gwajakowej do mikrochemicznej próby na enzymy i przypisuje powstawanie niebieskiego zabarwienia diastazie (amylazie). Reakcję wykonywał na skrawkach ziemniaka. P a w ł e w s k i ('97) poddał krytyce ten pogląd i zaznacza, że wiele innych ciał np. białka, azoty, wywołują takie same zabarwienie. M o l i s c h ('28 p. 320) zaznacza, że w tkance roślinnej w większości wypadków tworzenie się błękitu gwajakowego należy przypisać peroksydazom.

Amyloplasty barwiły się, lecz niema dobrego umiejscowienia.

### 4. WYDZIELANIE JODU Z JODKU.

B a c h i C h o d a t ('02) używali zakwaszonego roztworu jodku potasowego z dwutlenkiem wodoru do ilościowego oznaczenia peroksydaz. Temu pogładowi przeciwstawił się A s o ('03), ponieważ po zagotowaniu reakcja z gwajakiem jest ujemna, a z jodkiem dodatnia. Autor ten uważa, że reakcja ta wypada dodatnio pod wpływem kwasu azotawego, wytwarzającego się w żywej komórce. B a c h ('13) zaś sądzi, że powyższa reakcja jest wywołana przez fenolazę i odpowiada niebieszczeniu gwajaku. Oksydazy, występujące w ziemniaku, powodują utlenienie jodku do jodu bez dodatku wody utlenionej. Obecnie E v a r d ('28 p. 18) używa tego sposobu na skrawkach z bulwy ziemniaczanej i podaje, że zabarwienie niebiesko-fioletowe zjawiające

się na ziarnach skrobi od wydzielonego jodu, jest spowodowane obecnością enzymu i zaznacza, że wskazuje to zarazem na umiejscowienie.

Postępując według przepisu *Evarda*, otrzymałam oprócz zabarwionych ziaren, brunatno zabarwione amyloplasty, z których można usunąć jod chloroformem. A więc reakcja ta wskazuje również na występowanie utleniającego enzymu na powierzchni skrobi w amyloplacie.

##### 5. UTLENIANIE ADRENALINY.

Niejednokrotnie wykryto tak w zwierzęcym, jak i w roślinnym organizmie enzymy utleniające adrenalinę, taki enzym stwierdzono we krwi raków (*Langlois* '97), w wyciągach z dębiana i z nadnerczy dotkniętych czerniakiem (*Neuberg* '08), w grzybach (*Abderhalden* u. *Guggenheim* '08), w wyciągach z melanotycznych tkanek cieląt (*Jaeger* '09), w moczu krwi osobników chorych na melanosarkomę (*Scaki* '22). *Ransom* ('12) pierwszy wykrył enzym utleniający adrenalinę w ziemniaku. Do mikrochemicznej próby użyłam wodnego roztworu czystej adrenaliny 1 : 10000: skrawki włożone do kropli takiego roztworu bez przykrywania szkiełkiem nakrywkowym, pod wpływem tlenu powietrza dają prędzej czerwone zabarwienie, niż po przykryciu. Zabarwienie to występuje po kilku minutach i po godzinie dochodzi do największego natężenia; jest ono rozlane w całej komórce, jednakowoż silniejsze w amyloplastach.

Jeżeli zaś skrawki są trzymane w roztworze adrenaliny 1 : 20000 w alkoholu 45° w małej probówce, do której jest dostęp powietrza, to z początku powstaje to samo zabarwienie, co przy opisanej już próbie z roztworem wodnym, lecz po trzech dniach zabarwienie czerwone przechodzi w brunatne, które po 6 dniach jest już zupełnie ciemne. Przejście od zabarwienia czerwonego do brunatnego wymaga dłuższego czasu, co przy użyciu wodnego roztworu adrenaliny nie może być osiągnięte, ponieważ w roztworze wodnym skrawki podlegają psuciu i zabarwienia brunatnego nie można otrzymać.

Przy użyciu roztworu alkoholowego umiejscowienie zabarwienia jest cokolwiek lepsze, gdyż poza brunatnem zabarwieniem



całej tkanki, są słabo brunatne ziarna skrobi i silniej zabarwione amylopasty. Nie jest wykluczone, że enzymem utleniającym adrenalinę w ziemniaku, jest tyrozynaza.

#### REAKCJA NA TYROZYNAZĘ.

Tyrozynaza posiada własność utleniania tyrozyny i hydroksylowych pochodnych benzolu, a następnie kondensowania ich do ciemnych barwików — melanin<sup>1)</sup>).

##### a) REAKCJA Z TYROZYNA.

Chodat i Staub ('07) używali roztworu tyrozyny do oznaczenia kolorymetrycznego zawartości tyrozynazy. Hasebroek<sup>2)</sup> zaś zastosował ją do celów mikrochemicznych. Pod wpływem nasyconego roztworu tyrozyny otrzymywał zmiany zabarwienia na skrawkach; początkowo wytwarza się czerwone, następnie fioletowe, przechodzące po 1 dniu w czarne, zabarwienie.

Skrawki w tyrozynie ciemniały po 24 godz., ziarna skrobi i amyloplasty są brunatne w takich skrawkach, nie można jednak prześledzić zmiany zabarwienia.

##### b) REAKCJA Z 0,1% ROZTWOREM SIARCZANU CHININY.

Boas i Merckenschlager ('25) badali tworzenie się melanin w ziemniaku pod wpływem działania tyrozyny i chininy na występującą w bulwach tyrozynazę. Obserwowali oni w próbkach czernienie kawałków ziemniaka, zanurzonych do roztworu chininy. Czernienie zaczynało się po 24 godz. i szło od góry, ponieważ tworzenie się melanin jest procesem fermentacyjno-utleniającym. Następnie stwierdzili oni zczernienie ziaren skrobiowych i wytłumaczyli to tem, że skrobia adsorbuje część barwika melaninowego, który tworzy się w komórce, podobnie, jak może pochłaniać różne barwiki.

Ja zaś rozumiem inaczej efekt tej reakcji: ponieważ na ziarnie skrobi znajdują się enzymy, dowodem czego są również i in-

<sup>1)</sup> Wohlgemut ('13) p. 261.

<sup>2)</sup> Péterfi ('28).

ne reakcje na oksydazy, zczernienie przeto występuje w miejscu lokalizacji enzymu, a więc na ziarnie skrobi, pod wpływem tyrozynazy działającej na tyrozynę powłoki amyloplastowej.

Amyloplasty przybierają również czarne zabarwienie.

### c) *PARAKREZOL I CUKIER.*

Do mikrochemicznego wykrycia tyrozynazy w bulwach ziemniaczanych, E v a r d ('28 p. 9, 21) używa p. krezolu, tworzącego błękit krezolowy w obecności tyrozynazy; autor ten stwierdził występowanie błękitno zabarwionych komórek w różnych częściach bulwy i kielków.

Stosując odczynnik Ewarda nie mogłam stwierdzić lokalizacji ani w amyloplastach, ani na ziarnach skrobi, zabarwienie rozlewa się po całej komórce.

Wykonane przeze mnie próby na oksydazy z benzydynam, pyrogalolem, jodkiem potasowym, adrenaliną, tyroziną, chininą wykazały obecność oksydaz i peroksydaz, przytem niektóre z nich pozwoliły określić rodzaj enzymu, a więc fenolazę i tyrozynazę (reakcja z jodkiem potasowym, następnie z tyroziną, chininą i adrenaliną) w amyloplastach i na powierzchni ziaren skrobi.

Inne reakcje na oksydazy i peroksydazy nie dały umiejscowienia, jak np. nalewka gwajakowa, p. krezol, aloina; piramidon zaś nie dawał zupełnie zabarwienia <sup>1)</sup>).

## II. CHLOROFILAZA.

B o r o d i n ('82) badał mikroskopowe tworzenie się kryształów chlorofilu u wielu roślin, na skrawki działał on alkoholem i po wyschnięciu pod szkiełkiem otrzymywał kryształy, które uważał za czysty chlorofil lub jego związek z jakimś nieznanym ciałem. M o n t e v e r d e <sup>2)</sup> dzieli rośliny na 3 grupy: do pierw-

<sup>1)</sup> Por. reakcje na enzymy, Rosenthaler ('28).

<sup>2)</sup> Willstätter ('28) p. 263.

szej zalicza takie rośliny, które dają jedynie bezpostaciowy chlorofil, do drugiej — rośliny dające bezpostaciowy i krystaliczny, a do trzeciej — rośliny, u których przeważa krystaliczny chlorofil.

Willstätter ('10, '28) we wszystkich roślinach zawierających chlorofil wykrył swoisty enzym, u jednych jest go dużo, u innych mało, skoro świeże lub suche liście potraktować alkoholem, następuje alkoholiza chlorofilu.

Sam chlorofil w alkoholu nie ulega zmianie, dopiero po działaniu enzymem zostaje zmieniony przez alkohol ('28 p. 254); reakcja ta nosi nazwę alkoholizy chlorofilu. Enzym ten zalicza się do esteraz, lecz nie da się zastąpić przez inne esterazy np. lipazę nasion rącznika lub trzustki. Z drugiej strony chlorofil jest specyficznym odczynnikiem na enzym liści.

Willstätter ('28) nazywa tę nową esterazę chlorofilazą, utworzony zaś przez esterazę produkt — chlorofilidem. Dodatek wody do roztworu alkoholowego chlorofilu wzmacnia działanie chlorofilazy (269).

Willstätter bada chlorofilazę w ten sposób, że do badanego proszku dodaje wyciągu alkoholowego lub acetono-wodnego chlorofilu; po godzinie działania powstają kryształy chlorofilidu.

Reakcji Willstättera użyłam do chemicznego wykrycia chlorofilazy.

ODCZYNNIK — roztwór chlorofilu przygotowywałam w ten sposób: użyłam liści rośliny, która zawiera mało chlorofilazy, a więc, jak podaje Willstätter (p. 280), liści pokrzywy — *Urtica urens*. Liście po wysuszeniu w temp. pokojowej w ciągu 2 dni zalałam wrzącym 96% alkoholem etylowym w stosunku 1 : 10, mocny bowiem alkohol nie wyługowuje chlorofilazy i wysoka temperatura niszczy ją; po zalaniu alkoholem sączyłam szybko po 5 min. wytrawiania sproszkowanych liści. Dzięki tym ostrożnościom otrzymałam roztwór chlorofilu, który po wolnem odparowaniu nie dawał kryształów etylchlorofilidu. Jeżeli odczynnik stoi kilka dni, należy go przy każdorazowym użyciu przesączyć, ponieważ w czasie stania strącają się w nim brunatne bezpostaciowe grudki.

Skrawek z bulwy ziemniaka nakraplałam roztworem chlorofilu, do którego dodałam tyle wody, aby alkohol był 80—90%

i po przykryciu szkiełkiem nakrywkowym zostawiłam w kamery wilgotnej; po 1—2 godz., skoro alkohol ulotnił się, badałam pod mikroskopem.

Otrzymałam charakterystyczne dla etylchlorofilidu zielone kryształki o kształcie trójkątnych lub sześciokątnych tafelek. Kryształki takie występują na ziarnach skrobi (Tabl. III rys. 2) i amyloplastach; mikrosomy zaś nie dają tych kryształów, można więc przy pomocy tej reakcji odróżnić amyloplasty od mikrosomów (chondriosomów, mitochondrjów). Kryształki są wprawdzie małe, lecz dobrze widoczne; świecą one w świetle spolaryzowanym. Reakcja ta wskazuje nie tylko na obecność (esterazy) — chlorofilazy w amyloplastach, lecz również i na to, że substancja białkowa, powlekająca ziarno skrobi pod tym względem nie różni się od amyloplasty.

Ponieważ obserwowano u ziemniaka tworzenie się chloroplastów z amyloplastów, przerobiłam również i tę znaną biologiczną próbę, wystawiając bulwy na działanie słonecznego światła: ziarna skrobi stawały się zielone, były one powleczone galaretowatą zieloną masą, stanowiącą resztę amyloplasty. Ponieważ amyloplast jest bezbarwny i powleka cienką warstwą wykształcone ziarno skrobi, dlatego do chwili zadziałania światła był niewidoczny na ziarnie.

Jest tedy rzeczą zrozumiałą, dlaczego amyloplasty mogą zamienić się w chloroplasty, zawierają bowiem chlorofilazę, która jest niezbędną towarzyszką chlorofilu.

### III. OKSYDOREDUKAZA.

Abelous i Aloy ('04) znaleźli w soku ziemniaczanym oksydoredukujący enzym. Michlin ('26, '28) opracował metodę dla otrzymania oksydoredukazy z ziemniaka; oznaczenie ilościowe przeprowadza on według metody Bacha ('23), redukując azotany, i Bernheima (p. 344), odbarwiając dzięki redukcji, błękit metylenowy. Pierwsza reakcja występuje w warunkach tak beztlenowych, jak i tlenowych, druga zaś tylko w beztlenowych.



Użyłam metody redukcji azotanów, lecz nie otrzymałam zadowalających wyników przy użyciu odczynnika Ilosway-Lungego ('89) dla wykazania powstałego kwasu azotawego.

REDUKCJA błękitu metylenowego wypadła lepiej: skrawek po włożeniu do roztworu błękitu 1 : 5000 odbarwia go. Dookoła ziaren skrobi i amyloplastów tworzy się jasna, bezbarwna sfera, lepiej widoczna, gdy się poruszy skrawkiem pod szkiełkiem i obserwuje izolowane ziarna z amyloplastami. W pierwszej chwili ziarna zabarwiają się na niebiesko, potem następuje odbarwienie błękitu, ziarna jaśnieją i dokoła nich płyn staje się bezbarwny. Żeby osłabić działania tlenu powietrza, reakcję wykonywałam na szkiełku z wgłębieniem (do kropli wiszącej), obwódząc brzegi szkiełka nakrywkowego waseliną. Próba kontrolna z ziarnami skrobi pozbawionymi enzymów przez długotrwałe wymywanie wodą (reakcje z benzydynam i pyrogalolem ujemne) nie wykazała odbarwiania błękitu metylenowego.

Skoro skrawek włożyć do roztworu wodnego stęż. kwasu jodowego, na ziarnach skrobi wydziela się jod, barwiąc je na niebiesko, a amyloplasty na czerwono-brunatno. Powyższe wydzielanie się jodu skłonna jestem przypisać działaniu oksydoredukazy, znajdującej się w amyloplastach i na skrobi.

## 5. GARBNIKI.

Używając, według przepisów Loewa i Bokornego ('89), Möllera ('88), Tumanna ('13 p. 253), Wisselingha ('15) i Sanio ('63) soli żelaza: chlorku, octanu, siarczanu, a następnie dwuchromianu i kwasu chromowego, nie otrzymałam dodatniego wyniku ani z amyloplastami, ani z ziarnami skrobi na garbniki.

## 2. Czynniki chemiczne i fizyczne, powodujące rozpad skrobi.

### A ROZPAD SKROBI DO POLIAMYLOZ PRZY POMOCY METAL. POTASU I SODU.

Poliamylozy czyli amylodekstryny otrzymał Schardinger ('04 — '11) przez działanie bacillus macerans na 5% kleik

skrobiowy. Po 6 — 8 dniach działania bakterij w temp. 40°, zo-  
bojętnił płyn ługiem sodowym i działając kolejno eterem, chło-  
roformem, otrzymał strą, który po przekrystalizowaniu z gorą-  
cej wody, nazwał „dekstryną  $\beta$ ”; przez odpowiednie traktowanie  
alkoholem pozostałego macierzystego ługu, otrzymał drugą kry-  
staliczną „dekstrynę  $\alpha$ ”. Pierwsza z tych dekstryn daje z jo-  
dem czerwono-brunatne zabarwienie, druga szaro-zielone.

Następnie P r i n g s h e i m i jego współpracownicy ('12 —  
'24) zapomocą tej samej biologicznej metody ze skrobi ziemnia-  
ka, ryżu, arrowrootu, kukurydzy i pszenicy, zarówno z amylopek-  
tyny, jak i z amylozy wyodrębnili 6 poliamyloz, które dzielą na  
*poliamylozy rzędu  $\alpha$*  i *poliamylozy rzędu  $\beta$* .

*Poliamylozy rzędu  $\alpha$* : krystalizują z alkoholu i dają z jodem  
ciemno - zielone metalicznie lśniące igły, jako produkty przyłą-  
czenia (addycji); należą do nich:

*oktamyloza*  $[(C_6H_{10}O_5)_2]_4$ ;

$\alpha$  — *heksaamyloza*  $[(C_6H_{10}O_5)_2]_3$ , łatwiej rozpuszczalna w  
wodzie, niż  $\beta$  — dekstryna;

*tetraamyloza*  $[(C_6H_{10}O_5)_2]_2 + 2 C_2H_5OH$ , czyli  $\alpha$  — dekstry-  
na Schardingera, do 17.4% rozpuszczalna w wodzie,

*diamyloza*  $(C_6H_{10}O_5)_2 + 2 H_2O$ , łatwo rozpuszczalna w wo-  
dzie.

*Poliamylozy rzędu  $\beta$*  krystalizują z wody i dają z jodem  
brunatno-czerwone graniastosłupy jako produkty przyłączenia,  
do nich należą:

$\beta$  — *heksaamyloza*  $[C_6H_{10}O_5]_3 + 9 H_2O$ , czyli  $\beta$  — dekstry-  
na Schardingera, około 2,4% rozpuszczalna w wodzie;

*triamyloza*  $(C_6H_{10}O_5)_3 + 4 H_2O$ , do 1,3% rozpuszczalna  
w wodzie.

Według szkoły P r i n g s h e i m a diamyloza powstaje z te-  
tra- i  $\alpha$  — heksaamylozy, triamyloza zaś z  $\beta$  — heksaamylozy;  
acetylowanie przemawia za tem, że podstawowym kompleksem  
skrobi jest raczej triamyloza, niż diamyloza.

K a r r e r i jego współpracownicy ('20—'22) są odmiennego  
zdania, uważając, że triamyloza ma być identyczna z  $\beta$  — heksa-  
amylozą, zrozumianą jako  $\alpha$  — heksaamyloza  $[(C_6H_{10}O_5)_2]_3$ ,  
a podstawowym kompleksem skrobi jest diamyloza, uważana za  
bezwodnik maltozy.

O ile poliamylozy łatwo lub trudno rozpuszczają się w wodzie, o tyle przyłączenia poliamyloz z jodem stanowią produkty nierozpuszczalne w wodzie.

Scharding er otrzymał poliamylozy drogą biologiczną, ja zaś otrzymałam je na drodze mikrochemicznej przez działanie metal. potasem lub sodem w alkoholu bezwodnym.

#### *DZIAŁANIE NA SKROBIĘ POTASEM METALICZNYM.*

Skrawki, po odwodnieniu alkoholem absolutnym, kładę do miseczki z takim samym alkoholem i dodaję kawałek metalicznego potasu. Miseczkę natychmiast przykrywam szkiełkiem, aby przeszkodzić zapaleniu się potasu. Po użyciu jednego kawałka potasu, dodaję drugi i t. d., aby utrzymać wydzielanie się wodoru w czasie mniej więcej 5 — 10 minut. Następnie skrawki wyjmuję i przemywam alkoholem absolutnym w celu zupełnego usunięcia utworzonego alkoholanu potasowego i obserwuję pod mikroskopem.

Zmianie podlega przedewszystkiem amyloza ziarna, a następnie i amylopektyna: obserwuje się, jak od ośrodeczka ziarna odchodzi szczelinka (Tab. IV, rys. 2, 1, 3), która przy silniejszej redukcji powiększa się, przytem w amylozie powstają igiełkowate bezbarwne kryształy. Oprócz tworzenia się kryształów, zachodzą zmiany w warstwach ziarna: warstwy przeświecają się, substancja bowiem wypełniająca je rozpuszcza się. Użycie met. potasu doprowadziło do powstania w ziarnie skrobi krystalicznego produktu, który w wodzie łatwo rozpuszcza się.

Jeżeli na preparat w alkoholu podziałać nalewką jodową, to kryształy ulegają przemianie na większą ilość kryształów o zabarwieniu czerwonym, jak to widać na Tabl. IV, rys. 4 i 5. Przekształcenie się kryształów bezbarwnych w czerwone pod wpływem jodu odbywa się bardzo szybko. Utworzone kryształy są już nierozpuszczalne w wodzie.

Otrzymany związek daje z jodem oprócz igiełek i słupków (Tabl. IV, rys. 5, 7) kryształy zebrane w gwiazdki (Tabl. IV, rys. 6 i 8-a) również o zabarwieniu czerwonym, a także igiełkowate i pryzmatyczne zielone kryształy, wychodzące z obwodu ziarna (Tabl. IV, rys. 8-b). Jeżeli użyć, zamiast nalewki jodowej, roztworu jodu w jodku potasowym, kryształy otrzymane po

działaniu potasem w pierwszej chwili rozpuszczą się, a potem wykrystalizują igły o zabarwieniu czerwonym i zielonym. lecz obraz jest mniej wyraźny, ponieważ całe ziarno zabarwia się na niebiesko-fioletowo, czego niema przy alkoholowym roztworze jodu.

*Reakcja z sodem metalicznym* przebiega mniej energicznie, lecz prowadzi do powstania tych samych obrazów.

Pod wpływem działania potasu lub sodu metalicznego otrzymałam krystaliczne poliamylozy, które z jodem dają produkty krystaliczne o zabarwieniu czerwonym i zielonym, z tych czerwone powstają przez rozpad amylozy, a zielone — amylopektyny.

Aby reakcja przebiegła pomyślnie, trzeba zachować pewne warunki, mianowicie skrawki muszą być odwodnione a po zakończeniu działania metali dobrze przemyte alkoholem celem usunięcia alkoholu, który przy reakcji z jodem będzie przeszkadzać, dając kryształ y jodoformu. Czas wykonania reakcji ma wpływ na ilość powstających kryształów, działanie wodoru in statu nascendi nie może trwać krócej, jak 5 minut.

#### B. WPŁYW BROMOWANIA, CHLOROWANIA, ACETYLOWANIA, METYLOWANIA I UTLENIANIA.

Wprowadzając do mikrochemji metody, które służyły w makrochemji skrobi <sup>1)</sup> do otrzymania jej produktów rozpadu o ścisłym składzie chemicznym lub otrzymania skrobi rozpuszczalnej <sup>2)</sup>, mogłam stwierdzić, że odczynniki, używane w tych metodach działają przedewszystkiem na amylozę, a na otoczkę amylopektynową znacznie słabiej.

*Brombromkalium* w ciągu kilkunastu godzin rozpuszcza wewnątrz ziarna całkowicie, pozostawiając tylko otoczki. Podobne jest działanie par bromu, lecz znacznie wolniejsze.

---

<sup>1)</sup> Karrer ('20), ('21), ('23).

<sup>2)</sup> Między innymi otrzymywaniem skrobi rozpuszczalnej zajmowali się: Doroszewski i Rakowski ('07), Kantorowicz ('12), Syniewski ('98), Wróblewski ('97), Zulkowski ('80), ('90).



*Działanie chloru in statu nascendi* (trzymanie preparatu nad probówką z wywiązującym się gazem) jest takie, jak przy działaniu bromu, lecz czas działania musi być o wiele dłuższy.

*Bromek acetylu* w roztworze kw. octowego lodowatego działa szybko: w ciągu 15 min. wewnątrz ziarna zostaje zamienione w masę kropelek, jednakowoż nie dochodzi do krystalizacji powstałej acetobromomaltozy. *Obraz działania chlorku acetylu i siarczanu dwumetylu* jest taki sam.

*Utlenianie skrobi nadsiarczanami* (których używano w celu otrzymania skrobi rozpuszczalnej), a więc nadsiarczanem amonu, sodu, potasu in substantia w skrawkach w środowisku alkalicznym (5%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , względnie  $\text{NaOH}$ ) przebiega energicznie i również prowadzi do otrzymania otoczek.

#### C. DZIAŁANIE PROMIENI LAMPY KWARCOWEJ NA ZIARNA SKROBI.

Nadson i Rochlin ('28) naświetlali liście *Pterygo-phillum hepaticae-folium* lampą kwarcową. Odległość obiektu od lampy wynosiła 30 cm., czas naświetlania 30 — 40 minut, efekt działania występował po 3 — 4 dniach. Skrobia w chloroplastach ulegała zamianie na szczawian wapnia. Początkowo ziarna skrobi barwiły się na fiołkowo, potem brunatno i wreszcie zupełnie nie dawały reakcji z jodem, zamieniając się na kryształ szczawianu wapnia. Nadson objaśnia to zjawisko zwiększeniem oksydacji w komórce przez działanie promieni, co wywołuje zmianę skrobi w kw. szczawiowy, a cukier prawdopodobnie tworzy stan przejściowy. Massol ('11) naświetlał roztwór skrobi i obserwował również zmianę zabarwienia z jodem i proces zcukrzenia. Bielecki i Wurmser ('12) badali również działanie promieni ultrafioletowych na skrobię i doszli do tego samego wyniku: zcukrzenie, tworzenie się dekstryn, pentoz i formaldehydu. Samec i Zorka Antonowicz ('27) działali promieniami na skrobię suchą przy dostępie powietrza, a również z wykluczeniem go. Skrobia taka dawała kleik redukujący, zawierający maltozę. Naświetlając zaś roztwór skrobi, otrzymali dalej posuniętą peptyzację, niż przy skrobi suchej. Ultrafiltrat po wolnem odparowaniu przedstawiał widoczną pod mikroskopem ziar-

nistość, dwójłomne igiełkowate i pryzmatyczne kawałki. Czy następuje tu wytwarzanie kryształów, czy jest to dwójłomność żelu, S a m e c nie może jeszcze tego wyjaśnić (p. 393).

*Skrobię naświetlałam lampą kwarcową typu Bacha (V — 220, A—3,7 kw. 0,7). Początkowo naświetlałam skrawki i całe bulwy z odległości 30 cm., tak jak podaje Nadson, lecz efekt był minimalny, po 30' naświetlania skrawków lub po 1½ godz bulw, ziarna skrobi wykazywały tylko zwiększenie barw interferencyjnych w kwadrantach między ramionami krzyża (opis normalnego ziarna w świetle spolaryzowanym podaje Reichert ('13. 2 p. 882). Następowoło silne rozszczepienie światła, występowały barwy niebieska i żółta, często również jedno z ramion krzyża było rozdwojone i nie miało czarnego zabarwienia, lecz rozlewającą się barwę granatową o brzegach niebieskich, przy skrzyżowanych nikolach.*

Następnie zmniejszałam odległość od lampy do 15 cm, temperatura wynosiła wtedy 52—55° C. Wynik był lepszy, po 18 godz. od czasu naświetlenia można było zauważyć dużą zmianę w ziarnach. Skrawki z bulw naświetlanych w ciągu 1 godziny wykazały następujące zmiany: ziarna skrobi straciły uwaśnienie, na niektórych zaznaczyła się wyraźnie otoczka, w świetle spolaryzowanym świeciły, lecz nie miały już czarnego krzyża, z jodem dały zabarwienie czerwonawo-brunatne (*Tabl. III, rys 3-ci*) są to ziarna *a*. Potem zmiana idzie dalej: wewnątrz ulega rozpuszczeniu, zostaje otoczka, która już nie świeci (*b*) i z jodem nie barwi się. Na niektórych ziarnach widać kryształy, które świecą, podczas gdy ziarno jest ciemne (*c*), również występują kryształy tafelkowate, pogrążone w substancji galarętowatej (*d*). Bliżej obwodu, gdzie działanie promieni było silniejsze, widać w komórkach całą masę kryształów — *rys. 4 (b)*. Kryształy są rzadko pojedyncze, w postaci słupków, przeważnie poznaczane, przypominają kształtem litery K, X, H. Widać również ziarna skrobi wewnątrz zawierające kryształy (*a, a\**). Tworzący się kryształ w ziarnie (*a*) świeci z początku słabo. Również kryształy wychodzące z małych, zanikających ziaren (*c*), są dwójłomne, silnie świecą, a pozostała część ziarna nie barwi się zupełnie z jodem.

*Własności kryształów są następujące:*

- 1) w wodzie nie rozpuszczają się,
- 2) w kw. octowym lodowatym, 10% i 2% nie rozpuszczają się,
- 3) w kw. solnym 10% rozpuszczają się łatwo,
- 4) w kw. azotowym rozpuszczają się,
- 5) w kw. siarkowym 10% i 80% ulegają rozpuszczeniu, jednakowoż nie dochodzi do wytworzenia się igieł gipsu,
- 6) w wodorotlenku potasowym 50% nie rozpuszczają się,
- 7) niektóre kryształy przemyte od wodorotlenku potasowego rozpuszczają się w kw. octowym.

Wobec tego, że w ziarnie skrobi występują katjony: potasu, magnezu i w małej ilości wapnia, więc powstałe kryształy mogą być solami organicznymi tych katjonów.

Nie są to kryształy szczawianu wapnia, ponieważ nie dają igieł siarczanu wapnia z kw. siarkowym. Rozpuszczalność, następnie zatracenie dwójłomności i rozpuszczanie się w kw. octowym po działaniu ługiem wskazuje na szczawian magnezu<sup>1)</sup>. Lecz nie wszystkie kryształy zachowują się tak, większa część nie rozpuszcza się po ługu w kw. octowym. Być może są to kryształy kw. śluzowego, który powstaje przez utlenienie glukozy. Znane jest również przejście glukozy w kw. cytrynowy<sup>2)</sup>, nie jest to jednak sól kwasu cytrynowego.

Jeżeli bulwy ziemniaka naświetlać z odległości 10 cm., temperatura wynosi wtedy 65 — 70° C., skrobia ulega skłajstrowaniu i nie dochodzi do wytworzenia kryształów.

Pod wpływem promieni lampy kwarcowej następuje zmiana w chemizmie ziarn skrobi, tworzą się produkty rozpadu, z których jednym jest kwas szczawiowy, łączący się z magnezem, wchodzącym w skład ziarna. Oprócz szczawianu magnezu powstaje jeszcze inny związek krystaliczny, którego jednak nie udało mi się bliżej określić. Powstanie szczawianu magnezu, a nie szczawianu wapnia, który otrzymali N a d s o n i R o c h l i n z naświetlonej w chloroplastach skrobi, mogę wytłumaczyć w ten

<sup>1)</sup> Własności szcz. magnezu: M o n t e v e r d e ('90).

<sup>2)</sup> B e r n h a u e r ('28).

sposób: na ziarno skrobi, a więc polisacharyd, w skład wnętrza którego wchodzi magnez, nie wapń, otoczone cienką powłoką amyloplasty, zawierającego w minimalnej ilości wapń, działają promienie lampy kwarcowej, skutkiem tego jest rozpad skrobi. przytem zaczyna się on od wewnątrz ziarna i zmierza ku obwodowi; tworzą się produkty krystaliczne wewnątrz ziarna wtedy, gdy otoczka jest jeszcze nie zniszczona, a więc występujący w niej wapń nie może brać udziału w tworzeniu się nowych związków, magnez zaś obecny na miejscu wytrąca kw. szczawio-owy w postaci nierozpuszczalnego szczawianu magnezu.

*Skrobia naświetlona na sucho:* ziarna wymyte z tkanki i wysuszone naświetla się z odległości 15 cm., w ciągu 1 godz. Ziarna pozornie niezmienione, gdy je obserwować w alkoholu, po dodaniu wody rozpuszcza się amyloza i uwidocznia stroma ziarna. (Tabl. VI, rys. 1, *a* i *b*). Ulega więc zmianie amyloza i amylopektyna, nie dochodzi jednak do wytworzenia się kryształów, powstają produkty inne, rozpuszczalne w wodzie, nic dziwnego, bo i warunki są zmienione. Wytwarzanie się kryształów odbywa się wtedy, gdy są enzymy, gdy ziarno znajduje się w żywej tkance.

#### POWSTANIE MELANIN W NAŚWIETLANYCH BULWACH.

Po 18 godz. od końca naświetlania widać na przekrojach przez bulwę strefę górną, objętą działaniem promieni lampy kwarcowej, różniącą się od dolnej. Tablica V, fot. A.

#### BULWA NAŚWIETLONA Z ODLEGŁOŚCI 15 CM.:

Czas naświetlania = 1 h. (bulwa 1 i 2):

*górną sferę* złożoną z części zewnętrznej o barwie *jasno-brunatno-żółtej* i wąskiej wewnętrznej, tworzącej pas *ciemno brązowy*;

*dolną sferę* posiada zabarwienie normalne.

Czas naświetlania =  $1\frac{1}{2}$  h:

zczernienie silniejsze, różnice sfer jeszcze bardziej zaznaczone.



*BULWA NAŚWIELLONA Z ODLEGŁOŚCI 10 CM:*

Czas naświetlania  $1\frac{1}{2}$  i 1 h (bulwa 5):

wykazuje obraz ten sam:

*Górna sfera:* zewnętrzna część szeroka, jasna, *szklista* (badanie mikroskopowe wykazało obecność skrobi sklejastowanej).

*Dolna sfera:* posiada zabarwienie *normalne*.

Tworzenie się melanin wzmagą się stale i po 3-ch dniach od czasu naświetlania jest duże zczernienie, co wykazuje fotografia B na tablicy V. Wszystkie bulwy, niezależnie od czasu naświetlania, mają sferę, objętą działaniem lampy kwarcowej, po kilku dniach ciemną, przytem zczernienie nie ogranicza się do tej sfery, lecz posuwa się wгłęb jasnej sfery dolnej, w bulwach krócej naświetlanych niezbyt daleko, w dłużej lub bliżej naświetlanych prawie do samego końca, tak że prawie cały przekrój przez bulwę jest czarny. Można to objaśnić głębszym wnikaniem promieni. Przy badaniu mikroskopowym części zczerniałych stwierdziłam zabarwienie brunatne (zabarwienie zależy od stopnia rozproszenia melanin B o a s ('25), występujące na ziarnach skrobi, amyloplastach; plazma i jądro było również zabarwione. Obraz jest podobny do tego, jaki występuje przy reakcji mikrochemicznej na tyrozynazę.

Promienie lampy kwarcowej działają więc na utleniające enzymy, pobudzając je do funkcji, albowiem w stanie spoczynku bulwy funkcja enzymów jest zahamowana. Dlaczego na samym obwodzie część bulwy pozostaje przez czas dłuższy jasno zabarwiona i dlaczego w tej części występują kryształki (z wyjątkiem bulwy 5, gdzie skrobia jest sklejastowana), tego nie mogę wyjaśnić; dziwna również jest droga tworzenia się melanin od środka bulwy ku obwodowi w obie strony.

Badanie na peroksydazy z benzydyną wykazało obecność enzymów w naświetlanych bulwach, najmniej ich jest w bulwie ostatniej 5-ej. Reakcja na chlorofilazę wypadła słabo we wszystkich bulwach.

Porównując bulwy naświetlane z odległości 30 cm., 15 cm. i 10 cm. sądzę, że w pierwszym wypadku działanie promieni jest za słabe, aby mogło wywołać utlenienie ziaren skrobi do jej produktów odbudowy, w drugim wypadku działanie jest optymalne

i w trzecim znowu za silne, niszczące prawdopodobnie utleniające enzymy; kryształy nie wytwarzają się w warstwie skłajstrowanej, powstają one dopiero głębiej, pod tą warstwą, gdzie skrobia nie uległa skłajstrowaniu.

Enzymy, występujące na powierzchni ziarna skrobi pod wpływem promieni lampy kwarcowej, działają ze wzmożoną energią, wywołując rozpad skrobi, przytem dochodzi do powstania prawdopodobnie soli kwasów organicznych, między innymi zaś szczawianu magnezu.

#### D. DZIAŁANIE ENZYMÓW W TEMPERATURZE PONIŻEJ 0°.

##### 1. DZIAŁANIE NISKIEJ TEMPERATURY NA BULWY.

Skrobia poddana działaniu temperatury poniżej 0° podlega zmianom. Ziarna zostają rozpuszczone w dwojaki sposób: od ośrodeczka (Tabl. VI, rys. 2), albo od obwodu ziarno rozpuszcza się stopniowo, przytem silniej w miejscach rzadszych ziarna, co robi wrażenie jakby ziarno było poprzewężane (Tabl. VI, rys. 3).

Pierwszy rodzaj rozpuszczania się ziaren zaobserwowałam w tych bulwach, w których rozpuszczanie się skrobi było słabe, tam formy drugiego rodzaju, gdzie znikanie ziaren odbywało się szybko. W miarę rozpuszczania się skrobi zmienia się jej chemizm: ziarna, z których pozostały zaledwie ślady (Tabl. VI, rys. 3b) barwią się z jodem na żółto, a pozostałe otoczki po rozpuszczonych ziarnach (Tabl. VI, rys. 3, c.) nie wykazują już zupełnie zabarwienia. Amyloplasty pozostają niezmienione, często są wewnątrz puste, gdyż zawarte w nich poprzednio ziarno skrobi uległo rozpuszczeniu (Tabl. VI, rys. 3, d.).

Szybkość rozpuszczania się ziaren jest różna w bulwach małych i dużych. Temperatura, w której rozpoczyna się rozpuszczanie skrobi jest również zmienna dla bulw różnej wielkości. Najbardziej wrażliwe na oziębianie są zawiązki bulw, grubiejące końce pędów, których waga wynosi około 0,1 g.; wystarcza już  $t = 0^{\circ}$ , aby skrobia uległa rozpuszczeniu w ciągu 18 godzin, w temp. niższej np. —  $1^{\circ}$  już w przeciągu kilkunastu minut skrobia znika całkowicie. Dla bulwek większych wagi 0,5 — 1,0 nie wystarcza ochłodzenie do  $0^{\circ}$ , trzeba obniżyć temperaturę do  $-1^{\circ}$ , aby rozpoczęło się rozpuszczanie ziaren, które znikają cał-

kowicie, jeżeli bulwki wagi 0,5 g. oziębiać w ciągu 15 minut, a 1,0 g przez  $\frac{1}{2}$  godziny.

W bulwkach większych wagi 7,0 — 10,0 g. w t. —  $3^{\circ}$  rozpoczyna się rozpuszczanie w komórkach obwodowych bulwy, lecz nie dochodzi do rozpuszczenia skrobi w całej bulwie, mimo to, że czas oziębiania zostaje przedłużony do kilku dni lub temperatura obniżona do  $-8^{\circ}$  w ciągu 18 godzin.

Bulwy duże, wagi kilkunastu i kilkudziesięciu gramów zachowują się w ten sposób, że oziębianie poniżej zera do  $3^{\circ}$  już wpływa uczynniająco na enzymy, w komórkach obwodowych bulwy, skrobia znika w ciągu godziny, widać rozpuszczające się ziarna, lecz nie można już wpłynąć na zwiększenie się rozpuszczania, ani przez obniżenie temperatury, ani przez przedłużenie jej działania.

Z zachowania się dużych i małych bulw widać, że w małych bardzo łatwo można doprowadzić skrobię do rozpuszczenia w całej bulwie, w dużych zaś tylko w komórkach obwodowych i to nie całkowicie. Próbowalam znaleźć przyczynę, dlaczego tak różnie zachowują się bulwy, czy nie wpływa na to ilość enzymów?

Wychodząc z założenia, że od ilości protoplazmy zależy ilość wytwarzanej przez nią amylazy, iż mniej lub więcej szybkie rozpuszczenie się skrobi pod wpływem zimna uzależnione jest od rozwoju komórki i od związanego z marnieniem amyloplasty rozwoju skrobi.

W komórkach młodszych, zbliżonych do miazgi (*cambium*), zawierających więcej protoplazmy i enzymów oraz młodocianą, formującą się skrobię, powleczoneą jeszcze grubym amyloplastem, proces ten odbywa się energiczniej, aniżeli w komórkach starszych bardziej oddalonych od miazgi, a zarazem uboższych w protoplazmę i enzymy, tudzież zawierających skrobię o zmniejszonej powłoce amyloplastowej.

Rozumowanie to jest zgodne ze stwierdzonemi przeze mnie faktami: w małych bulwach, w których skrobia pod wpływem zimna zostanie całkowicie rozpuszczona, znikanie ziaren zaczyna się w komórkach mięksiszowych, sąsiadujących z wiązkami sitowo - naczyniowymi, a później ogarnia i komórki dalej położone, a w większych bulwach rozpuszczanie się ziaren ogranicza się tylko do miększu około wiązek, co widać dobrze na podłużnych



przekrojach przez bulwy; duże ziarna skrobi, jak wykazało badanie składu chemicznego, zawierają mniej składników amyloplasty i wreszcie ogólna ilość enzymów jest większa w bulwach małych, niż dużych. Przypuszczając, że równorzędnie ze zwiększoną ilością peroksydaz zwiększy się i ilość amylazy w ziemniaku, wykonałam oznaczenie peroksydaz.

W celu porównania ilości enzymów, zawartych w małych i dużych bulwach, a także i w kielkach, wykonałam oznaczenie kolorymetryczne, ponieważ przy reakcjach mikrochemicznych nie mogłam stwierdzić wybitnej różnicy.

W oznaczeniu enzymów chodziło mi jedynie o wykazanie stosunku między wielkością bulwy, a ilością enzymów, nie zaś o ich bezwzględną zawartość. Wobec tego wykonałam oznaczenie w ten sposób, że równe ilości miazgi ziemniaczanej, mianowicie 0,3 g. bulw różnych wielkości, a więc wagi: 1) 14,05 g., 2) 6,00 g., 3) 1,60 g., 4) 0,45 g. i 5) kielków wagi każdy po 0,10 g. wytrawiałam 3 cc wody destylowanej w ciągu 3 godzin. Aby usunąć działanie tlenu powietrza, wkropliłam do każdej próbówki po 2 krople oleju parafinowego. Po upływie trzech godzin, przesączyłam zawartość każdej próbóweczki i wykonałam 3 równorzędne oznaczenia kolorymetryczne: jedno z roztworem benzydyny, drugie z pyrogalolem, trzeciem zaś oznaczeniem było utleniające działanie powietrza na tyrozynazę obecną w wyciągu, który pozostał w odkrytej próbówce.

Oznaczenie kolorymetryczne przy pomocy benzydyny wykonałam w następujący sposób: do 0,1 cc wyciągu enzymów dodałam 0,9 cc wody i następnie 1 cc roztworu benzydyny (odczynnik przyrządzony według przepisu Raciborskiego). Płyn odmierzałam pipetą do probówek objętość 6 cc i równej szerokości, zabarwienie zaś obserwowałam w silnym, przepuszczonym przez szkło matowe, świetle lampy elektrycznej.

Intensywność powstałego niebieskiego zabarwienia była różna: najsilniej zabarwiony był wyciąg z kielków, cokolwiek słabsze zabarwienie miał wyciąg z bulwy wagi 0,45 g. natężenie zabarwienia wyciągów bulw 1,60 g., następnie 6,00 g. i 14,05 g. kolejno było słabsze.

Ten sam, odwrotnie proporcjonalny stosunek między wielkością bulwy, a ilością enzymów wykazało zachowanie się wyciągów względem roztworu pyrogalolu. Do tej próby musia-



łam użyć większej ilości wyciągu, mianowicie 1 cc, albowiem powstające tu zabarwienie jest znacznie słabsze, niż przy benzydynie.

Z wyciągów wodnych enzymów również najsilniej zmienia się na powietrzu wyciąg z kiełków i małych bulwek, a więc te trzy oznaczenia, dające wyniki zgodne, wskazują na to, że enzymów utleniających jest najwięcej w kiełkach i małych bulwkach, że ze wzrostem wagi bulwy ilość ich maleje.

Zrozumiałem jest wobec tego dlaczego w mniejszych bulwach i kiełkach skrobia podlega szybkiemu rozpuszczeniu i znika całkowicie, albowiem kiełki i małe bulwy zawierają więcej enzymów, niż duże.

Jeżeli bulwy oziębić szybko do  $-20^{\circ}$ , następuje również rozpad skrobi, lecz jest słaby, dowodzi to jednak, że funkcja enzymów, nie zależy od życia komórki, ponieważ temperatura śmierci poniżej  $0^{\circ}$ , związana z nieodwracalną plazmolizą w bulwach ziemniaka, leży według badań A p e l t a ('07), zależnie od rasy ziemniaków, w granicach  $-1,7^{\circ}$  do  $-3,08^{\circ}$ , słaby zaś rozpad w tej temperaturze wskazuje na to, że optimum działania enzymów, zawartych w bulwie ziemniaczanej, dla temperatur poniżej zera leży w granicach od  $0^{\circ}$  do  $3^{\circ}$ .

Dawno zrobiono spostrzeżenie, że zmarznęte ziemniaki są słodkie, P a y e n <sup>1)</sup> jednak przypisał wytworzenie się cukru rozpoczęciem się okresu wegetacji jeszcze przed zadziałaniem zimą. Dopiero M ü l l e r - T h u r g a u ('82) wyświetlił, że wytworzenie się cukru kosztem skrobi jest związane z obniżeniem się temperatury poniżej zera. A p e l t ('07) zaś, opierając się na jego pracy, próbuje wyjaśnić czy istnieje zależność między obniżeniem się temperatury śmierci komórki, a nagromadzeniem się cukru, powstałego przez rozpad skrobi.

Opisane przeze mnie formy rozpuszczania się ziaren w tkance ziemniaka pod wpływem enzymów, obserwował N ä g e l i i B a r a n i e c k i <sup>2)</sup>, a M e y e r <sup>3)</sup> otrzymał je przez działanie różnych enzymów na skrobię i porównawszy z obrazami, jakie

<sup>1)</sup> C z a p e k ('03), p. 465.

<sup>2)</sup> Cyt. wedł. B i n z ('92) p. 27.

<sup>3)</sup> M e y e r ('86) p. 87, 96, 98, 151, 222.

można znaleźć w roślinie, uważa, że roztwór diastazy podobnie atakuje ziarna, jak to czynią i chromatofory. Binz, badając starsze części łodygi przypuszcza, że rozpuszczanie to zależy od powłoki leukoplastu, otaczającego ziarno.

Ja zaś mogę przypuszczać po wykazaniu mikrochemicznym obecności enzymów na skrobi, że ziarna skrobi, które można znaleźć w stanie rozpuszczania się w mniejszych bulwach ziemniaka w okresie jesiennym, są rozpuszczane przez enzymy, znajdujące się na powierzchni ziarna pod wpływem bodźca, jakim jest obniżenie temperatury.

## 2. DZIAŁANIE NISKIEJ TEMPERATURY WOBEC JODU.

Skrawki w nalewce jodowej, rozcieńczonej alkoholem 96%, poddałam działaniu niskiej temperatury w ciągu 24 godzin. Temperatura w tym czasie wahała się od  $-9^{\circ}$  do  $-6^{\circ}$ .

Przy badaniu mikroskopowym tych skrawków, okazało się, że z obwodu ziarna skrobi wychodzą małe kryształy, igiełki i słupki o barwie zielonej (Tabl. VI, rys. 4a).

Po 56 godz. można było obserwować, oprócz zielonych kryształów również czerwone — c i bezbarwne b'' (Tabl. VI, rys. 4b), występujące w postaci słupków, lecz w mniejszej ilości, niż kryształy zielone.

Ciekawem jest to zachowanie się ziaren skrobi przy oziębianiu z jodem, nie zachodzi tu bowiem destrukcja ziarna, tak, jak pod wpływem samego zimna, nie widać tu rozpuszczających się ziaren, lecz z nienaruszonego napozór ziarna wyrastają barwne kryształy. Działanie enzymów jest więc tu inne, niż bez jodu, który zatruwa amylazę, jak to wykazały badania Ollsona ('21), niema więc typowego rozpadu ziarna, jak przy pełnym składzie enzymów, gdy stosowane jest tylko oziębianie. Ponieważ występujące tu zielone i czerwone kryształy nie rozpuszczają się w wodzie, barwa i własność kryształów wskazują na to, że zachodzi tu rozpad ziarna, prowadzący do powstania poliamyloz rzędów  $\alpha$  i  $\beta$ . Być może jest to czynność oksydoreduktazy, objawiającej swoje działanie przy niskiej temperaturze w obecności jodu, jedyne go enzymu z kompleksu utleniających i redukujących enzymów, jakie występują na ziarnie skrobi.

Co się tyczy bezbarwnych kryształów, które powstają obok zabarwionych, sądzę, że jest to substancja depolimeryzacji skrobi, a ponieważ nie daje produktu barwnego z jodem, więc byłaby to prawdopodobnie jakaś achrodekstryna.

Dotychczas otrzymywano achrodekstryny przez działanie kwasów <sup>1)</sup>.

---

---

<sup>1)</sup> Meyer ('95) p. 42; Litner u. Düll ('93), ('95), Samec ('19).

### III, STRESZCZENIE WYNIKÓW I WNIOSKI.

Badanie amyloplastów i ziaren skrobi dało następujące wyniki:

- 1) Skład amyloplastu i ziarna skrobi, nie biorąc pod uwagę polisacharydów, występujących w ziarnie, jest bardzo zbliżony.
- 2) Amyloplast składa się z białka, które jest glukoproteidem, podobnie, jak elajoplast <sup>1)</sup> i sekretogen <sup>2)</sup>, zawiera bowiem cukier związany: glukozę i maltozę;

w białkowej stronie amyloplastu znajdują się: wolna maltoza, lipoidy, a więc olej i fitosteryna, następnie enzymy, wśród których wyróżniłam peroksydazy, z oksydaz: tyrozynazę i fenolazę. z esteraz wykryłam chlorofilazę, wreszcie stwierdziłam oksydoreduktazę; nadto nieorganiczne składniki, są one w połączeniach organicznych i w stanie wolnym. W dużej ilości występuje potas, mniej magnezu, przytem oba kationy mogłam wykryć tylko jako związki wolne; w połączeniu organicznem nie udało mi się ich wykazać. Następnie znajduje się siarka, krzem i bardzo mało wapnia, niema natomiast sodu. Pozostaje jeszcze fosfor, lecz jego umiejscowienia nie mogłam stwierdzić w amyloplaście. Wreszcie reakcje mikrochemiczne wykazały nieobecność garbników.

Śród aminokwasów, wchodzących w skład białka, mogłam wyróżnić: tyrozynę, histydynę, tryptofan, argininę, być może, że znajduje się i asparagina, kw. asparaginowy i glumaminowy. Z występowania siarki można do pewnego stopnia sądzić o prawdopodobnem znajdowaniu się cystyny.

<sup>1)</sup> Ossowski ('27).

<sup>2)</sup> Mazurkiewicz ('26)



3) Pozostałością amyloplastu na ziarnie skrobi jest białko, powleka ono cienką warstwą całe ziarno, tworząc większe skupienie we wgłębieniu ośrodeczka. Na obecność białka na skrobi wskazuje występowanie siarki i reakcje barwne. Białko składa się ze związanych i wolnych aminokwasów, a więc: tyrozyny, histydyny, tryptofanu, argininy, prawdopodobnie i z asparaginy, kw. asparaginowego i glutaminowego i może z cystyny. A więc skład białka, występującego na skrobi jest taki sam, jak i amyloplastu, jednak więcej jest wolnych kw. aminowych na powierzchni ziarna i ośrodeczku, niż w amyloplaście.

Białko jest związane z glukozą w postaci glikoproteidu. Z cukrów występuje jeszcze na powierzchni skrobi maltoza, lecz już w stanie wolnym i w ilości bardzo małej.

Razem z białkiem występują substancje: lipoidy, olej i fitosteryna, enzymy, a więc oksydazy: tyrozinaza i fenolaza, peroksydazy, oksydoredukaza i chlorofilaza, z substancji nieorganicznych występuje w związku organicznym potas, wapń i magnez.

Dalej występuje krzem i siarka; sodu tak samo, jak i w amyplaście nie znalazłam.

4) We wnętrzu ziarna skrobi stwierdziłam obecność organicznie związanego potasu, magnezu, fosforu, siarki, krzemu i bardzo małej ilości białka, które znajduje się w bardzo nieznacznej ilości w części środkowej ziarna, w większej zaś wysięła od wewnątrz otoczkę i impregnuje ją.

Z dodatnich reakcyj, które wypadły na przekroju przez ziarno, mogę sądzić, że tyrozyna i tryptofan wchodzi w skład białka, które zostało w środkowej części ziarna. Krzem występuje w całym ziarnie, więcej jest go jednak w otoczce, gdzie tworzy skupienie w postaci ziarenek.

Podana niżej tabelka ilustruje rozmieszczenie poszczególnych składników w amyloplastach i ziarnach skrobi.

ROZMIESZCZENIE SUBSTANCYJ NIEORGANICZNYCH I ORGANICZNYCH W AMYLOPLASTACH I W ZIARNACH SKROBI.

Rodzaj składnika		Amyloplast	Zewnętrzna powłoka na ziarnie skrobi	Ziarno skrobi
Sód		—	—	—
Potas	nieorganiczny	+	+	
	organiczny			+
Magnez	nieorganiczny	+	+	
	organiczny			+
Wapń w związku organicznym		+	+	—
Krzem		+	+	+
Fosfor	organiczny			+
Siarka	organiczna	+	+	+
Białko		+	+	+
Kwasy aminowe wolne		+	+	
Tyrozyna		+	+	+
Histydyna		+	+	+
Tryptofan		+	+	
Arginina			+	
Asparagina i kw. asparag. i glutamin.		+	+	
Cystyna			+	+
Glukoza	związana	+	+	
Maltoza	wolna		+	
	związana	+	—	
Olej		+	+	
Fitosteryna		+	+	
Oksydazy i peroksydazy		+	+	
Tyrozynaza		+	+	
Fenolaza		+	+	
Chlorofilaza		+	+	
Oksydoredukaza		+	+	
Garbniki		—	—	

5) Jeżeli teraz porównać ilości wymienionych składników, występujących w amylopląście, na powierzchni i wewnątrz ziarna, to okaże się, że:

a) białko znajduje się na powierzchni ziaren, a więc na obwodzie otoczki, w mniejszej ilości przepaja ją równomiernie, często wyściełając ją od wewnątrz grubsza warstwa, we wnętrzu ziarna zaś są zaledwie ślady białka, które, jak wykazał odcz. dwuazowy, tworzy pasy, odpowiadające uwarstwieniu;

b) produktów rozpadu białka wolnych kw. aminowych jest więcej na powierzchni skrobi, szczególnie w ośrodeczku, niż w amylopląście;

c) glukozy związanej jest więcej w amylopląście, niż na powierzchni ziarna, również i maltozy, przytem w stanie związanym jest tylko w amylopląście; amyloplasty zawierają więcej

d) lipoidów a także i

e) enzymów: tyrozynazy, fenolazy, oksydoredukazy i chlorofilazy;

f) potasu nieorganicznego jest więcej w amyloplastach, niż na powierzchni ziarna, związany organicznie wchodzi w skład całej masy ziarna, tworząc połączenie z polisacharydami: amylopektyną i amylozą, nie daje reakcji na przekroju dotąd, dopóki nie zostanie zniszczona substancja organiczna; to samo dotyczy

g) magnezu;

h) fosfor mogłam wykryć tylko we wnętrzu ziarna;

i) wapnia amyloplasty i ziarna skrobi zawierają bardzo mało, występuje w związku organicznym i w skrobi ogranicza się tylko do otoczki, w której równie może być połączony z białkiem resztki amyloplasty, jak i z kw. amylofosforowym;

k) krzemu w amyloplastach jest mało, znacznie więcej w skrobi, w której tworzy większe skupienie w ośrodeczku ziarna i otoczce, którą nietylko przepaja równomiernie, „lecz także inkrustuje w postaci drobnych ziarenek; z całego ziarna najmniej krzemu zawiera jego wnętrze, lecz i ta ilość przewyższa zawartość amyloplastów;

1) siarka wchodzi w skład całego ziarna i amyloplastów.

6) Stosunek małych ziaren do dużych przedstawia się tak: małe ziarna skrobi naogół wykazują na swej powierzchni większą ilość składników amyloplastu, niż duże, zato w dużych zawartość katjonów i anjonów jest większa, niż w małych.

7) Działanie metal. sodem lub potasem w obecności abs. alkoholu daje, przy zachowaniu odpowiednich warunków, krystaliczne z jodem barwiące się na czerwono i zielono poliamylozy rzędów  $\alpha$  i  $\beta$ , które otrzymał Schardinger przy pomocy bacillum macerans.

8) Bromowanie, chlorowanie, acetylowanie, metylowanie i utlenianie narusza strukturę ziarna, wewnątrz jego zostaje rozpuszczone, otoczka jest oporniejsza, lecz i ona wreszcie zostaje zniszczona. Tworzące się produkty przemiany amylozy i amylopektyny są rozpuszczalne, do krystalizacji nie dochodzi.

9) Pod wpływem naświetlania lampą kwarcową bulw ziemniaczanych skrobia w komórce ulega przemianie: ziarno przekształca się na związki krystaliczne, z których jednym jest szczawian magnezu; obok tego procesu zachodzi tworzenie się melanin.

10) Działanie temperatury poniżej  $0^{\circ}$  prowadzi do rozpuszczania się skrobi. Temperatura początku rozpuszczania dla zawiązków i bulw małych, posiadających więcej enzymów, leży w granicach od  $0^{\circ}$  do  $1^{\circ}$ , dla bulw dużych od  $1^{\circ}$  do  $3^{\circ}$ . W małych bulwach wszystka skrobia ulega rozpuszczeniu, w dużych zaś tylko w komórkach w pobliżu miazgi. Również i temperatury niższe (np.  $-20^{\circ}$ ) wywołują rozpuszczanie się skrobi, które jednak jest słabe. *Optimum* działania niskiej temperatury dla bulw różnej wielkości leży między  $0^{\circ}$  a  $-3^{\circ}$ .

11) Jeżeli na skrobię działa jednocześnie niska temperatura i jod, wtedy ziarna podlegają słabej zmianie, struktura zostaje zachowana, lecz powstają związki krystaliczne, bezbarwne, czerwone i zielone, a więc achrodekstryny i poliamylozy rzędu  $\alpha$  i  $\beta$ .

Z powyższych wyników mogą wyprowadzić następujące wnioski:

1) Amyloplast pod względem chemicznym spokrewniony jest z chloroplastem, ponieważ zawiera chlorofilazę i przypusz-



czalnie magnez, nieodstępne składniki chlorofilu, dlatego też przy działaniu światła może ulec przemianie na chloroplast, ponieważ brakowało mu tylko jednego wyrunku do wytworzenia zieleni, a mianowicie energii świetlnej.

2) Amyloplast po wytworzeniu ziarna skrobi marnieje, pozostając na skrobi w formie szczątkowej, różniącej się tylko zawartością cukrów. Całkowity amyloplast zawiera glukozę i maltozę w formie związanej, przytem maltozy jest znacznie więcej, niż glukozy, na skrobi zaś występuje już maltoza w bardzo małej ilości i do tego w postaci wolnej, a więc maltoza amyloplastu zużywa się na wytworzenie skrobi po uwolnieniu się z połączenia białkowego, w jakim była uprzednio w amyloplacie. Z tego można sądzić, że amyloplast kondensuje glukozę do maltozy, z której następnie wytwarza bardzo złożoną cząsteczkę polisacharydu, przyczem następuje wycofanie białka i dlatego zjawia się wolna maltoza, której ślady wykryłam na powierzchni ziarna. Następnie występowanie cukrów w amyloplacie tłumaczy, dlaczego ziarno rośnie tylko tam, gdzie jest widoczny amyloplast w formie czapeczki, a tam gdzie jest jego cienka powłoka, już nie przyrasta; do wytworzenia bowiem skrobi potrzebna jest maltoza, której jest dużo właśnie w tej „czapeczce” — wytwórczym amyloplacie, podczas gdy w amyloplastowej powłoce na ziarnie już jej niema; została zużyta.

Ponieważ obecnie większość badaczy, jak to podałam w streszczeniu poglądów na skład chemiczny węglowodanów, przypisuje skrobi budowę glukozydu, mogę, opierając się na występowaniu glukoproteidu w amyloplacie, tworzącego maltozę (która ma konfigurację  $\alpha$  i  $\beta$  glukozydu) i skrobię, nazwać amyloplasty glukozydogenami.

3) Inne składniki chemiczne amyloplastu pozostają na ziarnie w tej samej liczbie, lecz w mniejszej ilości, z wyjątkiem kwasów aminowych, których jest więcej, a więc białko na skrobi jest shydrolizowane, co dowodzi rozpadu amyloplastu na ziarnie.

4) Następnie kationy i anjony biorące udział w wytwarzaniu się bardziej złożonej cząsteczki skrobi, zostają razem z cukrami koncentrowane, ponieważ w skrobi znajdują się w większej ilości, niż w amyloplacie, przykładem tego jest potas, magnez,

fosfor, krzem; jeden tylko wapń zostaje na skrobi w tak małej ilości, w jakiej był w amylopląście.

5) Ze względu na występowanie białka wewnątrz skrobi, w bardzo małej ilości wprawdzie, lecz zaznaczającego się umiejscowieniem, robiącym wrażenie warstw odśrodkowych, potwierdzam przypuszczenie Zwikkera, że ziarna skrobi ziemniaka powstają przez nakładanie — apositio, co zaznacza się wytknięciem przez amyloplast drogi, jaką kroczył, wytwarzając ziarno skrobi, przez pozostawienie części swego białka wewnątrz ziarna.

6) Amyloplast zostawia na ziarnie skrobi w otoczce białkowej enzymy, które wykazują działanie wtedy, gdy doznają pewnego bodźca. W okresie spoczynkowym bulwy funkcja ich jest zahamowana.

7) Bodźcem dla wprowadzenia enzymów w stan czynny są:  
a) promienie lampy kwarcowej oraz b) temperatura poniżej zera.

a) Enzymami, działającymi pod wpływem promieni lampy kwarcowej są oksydazy, wywołujące utlenienie skrobi do kwasów organicznych, z których jednym jest kwas szczawiowy, wiążący się z magnezem, występującym w skrobi, na szczawian magnezu. Oprócz oksydaz, wywołujących utlenienie skrobi, oksydaza-tyrozynaza utlenia tyrozinę amyloplastu i skrobi do melanin, wywołując brunatne zabarwienie skrobi i amyloplastów.

b) 1) Pod wpływem niskiej temperatury działają na skrobię enzymy, powodując rozpuszczanie się ziaren, przytem szybkość rozpuszczania zależy od grubości powłoki amyloplastowej. 2) Wobec jodu na zimnie powstają poliamylozy, z kompleksu enzymów, występujących na ziarnie, czynną jest prawdopodobnie oxydoredukaza.

8) Poliamylozy, otrzymywane dotąd na drodze biologicznej, mogą tworzyć się przez działanie na skrobię metal. potasem lub sodem, jak również pod wpływem temperatury poniżej 0° w obecności jodu.

AUS DEM INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND MEDIZINISCHE  
BOTANIK DER UNIVERSITÄT WARSCHAU.

Direktor Prof. Dr. WŁ. MAZURKIEWICZ.

F. W. KUDRZYCKA

## Mikrochemie der Stärkekörner und der Amyloplasten in Kartoffelknollen — *Solanum tuberosum*.

Die vorliegende Arbeit soll die Frage beantworten, welche mineralischen und organischen Substanzen in den Amyloplasten und im Stärkekorn enthalten sind, sowie ihre Verteilung in deren. Des weiteren wäre die Frage zu erörtern, ob am entwickelten Korne der Amyloplast noch in rudimentärer Form vorhanden ist. Schliesslich soll auch dem Einfluss chemischer und physikalischer Faktoren auf den Zerfall der Polysaccharide der Stärke Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Die Versuche wurden mit Schnitten aus frischen Knollen, sowie mit isolierten ganzen Stärkekörnern und mit Quer- u. Längsschnitten derselben vorgenommen. Die Schnitte durch die Stärkekörner wurden, nach Einbettung in Paraffin, mittels des Mikrotoms ausgeführt, wobei etwaige aus dem Plasma oder dem Zellsaft stammende Substanzen entsprechend entfernt wurden.

Bei der qualitativen chemischen Analyse wurden die allgemein bekannten mikrochemischen Reaktionen benutzt und ausserdem auch makrochemische Reaktionen angepasst.

Die Resultate dieser Forschungsarbeiten lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

Der Amyloplast besteht aus Eiweiss, das Glukose und Maltose in gebundener Form enthält. Im Eiweiss finden

sich folgende Aminosäuren vor: Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Arginin und mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch Asparagin, Asparagin- und Glutaminsäure sowie Cystin. Ausserdem erscheinen im Amyloplasten noch freie Maltose, Fett, Phytosterin, Pyroxydase, Tyrosinase, Phenolase, Chlorophyllase, Oxydoredukase, im ungebundenen Zustande Kalium und Magnesium, sowie in organischer Verbindung Calcium, Silicium und Schwefel.

Mit Rücksicht auf das Vorhandensein von Chlorophyllase und Magnesium zeigt der Amyloplast einerseits Verwandtschaft mit dem Chloroplasten, anderseits, was die mit dem Eiweiss gebundenen Zuckern betrifft, ein Glukoproteid, ähnlich wie der Elaioplast (Mazurkiewicz) und das Secretogen (Ossowski).

Die Aussenmembrane wie auch das Innere des Stärkekorns besitzt den Amyloplasten in rudimentärer Form.

Der rudimentäre Amyloplast tritt sowohl an der Peripherie der Amylopektinhülle des Korns und in grösserer Anhäufung im Kerne selbst auf und unterscheidet sich vom vollkommen entwickelten Amyloplasten dadurch, dass er weit mehr Aminosäuren enthält, dagegen weniger gebundene Glukose in Form des Glukoproteides, wie auch wenig freie Maltose.

Die übrigen chemischen Bestandteile bleiben die gleichen, jedoch treten sie in geringerer Menge auf, als im vollkommen entwickelten Amyloplasten.

Im Stroma des Stärkekorns treten auf: Eiweiss, zerstreut in kleiner Menge in der Amylose selbst, in grösserer Menge als dünne Schichte an der innern Amylopektinhülle, die auch vom Eiweiss durchtränkt ist. Dieses Eiweiss besteht aus Tyrosin und Tryptophan; von mineralischen Stoffen: Kalium, Magnesium, Silicium und Phosphor und zwar in grösserer Menge als in dem Amyloplasten. Calcium ist gleich spärlich vorhanden wie dort und beschränkt sich dieses ausschliesslich auf die Hülle des Korns.

Schwefel, Phosphor und Calcium treten in Verbindung mit den organischen Substanzen auf.

Wenn man von den Polysacchariden absieht, so ähnelt der Amyloplast in Bezug auf die chemische Zusammensetzung dem Stärkekorn. Der Unterschied liegt lediglich darin, dass die ge-



bundenen Aminosäuren und Zuckern bei den Amyloplasten vorherrschen, während die Kationen und Anionen im Innern der Stärkesubstanz und die freien Aminosäuren an der Kornoberfläche das Uebergewicht haben.

Dieser Unterschied sowie das Auftreten von Eiweiss im Innern des Stärkekorns sind eine Folge der Funktion des Amyloplasten, der mit Bezugnahme auf die Glukosid-Konstitution der Polysaccharide des Stärkekorns, den Namen Glukosidogen erhalten hat. Mit Berücksichtigung der Tatsache, dass das Eiweiss im Innern des Stärkekorns in Form exzentrischer Schichten vorkommt, wurde die von Zwickler stammende Annahme bestätigt, dass die Stärkekörner der Kartoffel durch Apposition entstehen. Es wurde auch klargestellt warum das Stärkekorn nur dort wächst, wo der Amyloplast in Form eines Mützchens vorhanden ist, dagegen nicht dort, wo er nur eine dünne Hülle bildet. Die Maltose des Amyloplasten löst sich aus der Eiweissverbindung, und wird zur Bildung von Stärke verbraucht und findet sich deshalb in kleiner Menge an der Oberfläche des Korns frei vor. Im rudimentären Amyloplasten des Korns finden wir keine Maltose mehr in Form des Glukoproteides vor, sie ist verbraucht und das Korn wächst daher unter der dünnen Schichte des Amyloplasten nicht mehr weiter. Im Glukoproteid des Amyloplasten gehen noch Värenderungen vor sich, die zu einer Hydrolyse des Eiweisses führen, worauf der vehrmehrte Gehalt an Aminosäuren in der Amyloplasthülle am Korne hinweist.

Bei der Kondensation der Glukose zur Maltose durch den Amyloplasten, welcher die weitere Bildung der noch komplizierten Molekel des Polysaccharides folgt, werden vom Amyloplasten die Kationen und Anionen konzentriert, wofür die Anhäufung des Kaliums, Magnesiums, Phosphors und des Siliziums innerhalb des Korns als Beispiel dienen kann.

Weiterhin hat die Verfasserin unter der Einwirkung von Natrium oder Kalium, wobei absoluter Alkochoh als Mittel diente, oder auch durch Anwendung von unterhalb 0° liegender Temperaturen, kleine Kristalle von Polyamylosen erhalten, welche aus dem Zerfall von Amylose und Amylopektin stammen und welche sich mit Jod rot oder grün färben. Bisher vermochte man zu den Polyamylosen nur auf biologischem Wege, durch die Tätigkeit des *Bac. macerans*, zu gelangen.

Die Bromierung, Chlorierung, Azetylierung, Methylierung und Oxydierung zerstört die Struktur des Korns, doch sind die dadurch entstandenen Produkte nicht kristallinisch.

Es zeigte sich schliesslich, dass die Bestrahlung der Kartoffelknollen mit Quarzlampenstrahlen eine Oxydation der Stärke zu organischen Säuren herbeiführte, von denen eine die Oxalsäure ist, die sich im Stärkekorn bei diesem Verfahren als kristallinisches Magnesiumoxalat bildet.

Die Wirkung der Temperaturen unter  $0^{\circ}$ , sowie der Quarzlampenstrahlen ist an die vermehrte Tätigkeit sei es durch die Einwirkung der Oxydoredukase, sei es durch die Einwirkung von Oxydasen gebunden, welche an der Oberfläche des Korns im rudimentären Amyloplasten auftreten und die die Bildung der obenerwähnten Zerfallsprodukte der Stärkepolysaccharide bedingen. Aehnliche Vorgänge finden wir auch bei der Aktivierung der Tyrosinase unter dem Einfluss der Quarzlampe und bei der Oxydation des Tyrosins im vollständigen und rudimentären Amyloplasten zu braunen Melaninen.

---

## PIŚMIENICTWO.

- Abderhalden E.* Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden Abt. 4 T. 12 (444).
- Abderhalden E. und Guggenheim M.* 1908. Weitere Versuche über die Wirkung der Tyrosinase aus *Russula delica* auf tyrosinhaltige Polypeptide und auf Suprarenin. Zeitschr. physiol. Chem. 57 (329).
- Abderhalden E. und Schmidt H.* 1911. Ueber die Verwendung von Triketohydrindendenhydrat zum Nachweis von Eiweissstoffen und deren Abbaustufen. Zeitschr. physiol. Chem. 72 (37).
- Abelous J. et Aloy J.* 1904. Sur l'existence d'une diastase oxydo-réductrice chez les végétaux. C. r. 138 (382, 1619).
- Agostini C.* 1887. Goldkalireagens zum Nachweis des Traubenzuckers. Chem. Zentralbl. 18 (99). Journ. Pharm. Chim. 14 (464).
- Allen E. und Thollens B.* 1890. Ueber Holzzucker und Holzgummi. Liebigs Ann. d. Chem. 260 (305).
- Apelt A.* 1907. Neue Untersuchungen ü. den Kältetod der Kartoffel. Cohn's Beitr. zur Biologie der Pflanzen 9 (215).
- Aso.* 1902. Bullet. of Coll. of Agric. Tokyo 5 (239); 1903. Beitr. bot. Zentralbl. 15 (208).
- Axenfeld D.* 1885. Eine neue Eiweissreaktion. Zentralbl. f. die medicin. Wissenschaft (209); Zeitschr. analyt. Chem. 24 (479).
- Bach A.* 1923. Pflanzliche Perhydridase. Zur Kenntnis der Reduktionsfermente. Biochem. Zeitschr. 52 (412).
- Bach A. und Chodat R.* 1902. Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. Ber. d. deut. chem. Gesell. 35 (2466).
- Bach A. und Sbarsky B.* 1912. Ueber das Verhalten der Phenolase gegen Säuren. Biochem. Zeitschr. 34 (473).
- Barfoed C.* 1873. Zeitschr. analyt. Chem. 12 (27).
- Behrens W.* 1908. Tabellen z. Gebrauch bei mikroskop. Arbeiten. 4 Aufl. (158).
- Bernhauer K.* 1928. Zum Chemismus der Citronensäurebildung durch Pilze. Biochem. Zeitschr. 197 (309, 327).
- Bernheim.* Biochem. Journ. 22 (344).
- Beyerinck.* 1912. De bouw der zetmeelkorrels. Versl. Wis-en Natuurk, afd. Kon. Akad. v. Wetensch. 92 (1252). Cytow. wedł. Zwikkera (6).
- Bielecki J. et Wurmser R.* 1912. Actions des rayons ultraviolets sur l'amidon. C. r. 154 (1429).
- Binz A.* 1892. Beiträge zur Morphologie und Entstehungsgeschichte der Stärkekörner. Diss. Zurich.

- Bloemendahl*. 1909. Wochenschr. f. Brauerei 33 (439).
- Boas F. und Merckenschlager F.* 1925. Pflanzliche Tyrosinasen. Biochem. Zeitschr. 155 (196).
- Boehm J.* 1883. Ueber die Stärkebildung aus Zucker. Bot. Ztg. 41 (33).
- Bonastre*. Journ. de Chim. médic. 4 (319).
- Borodin J.* 1882. Ueber Chlorophyllkrystalle. Bot. Ztg. 40 (608).
- Bourdois et Caventou*. 1828. Berzelius Jahresber. 7 (296).
- Brown H. und Heron J.* 1879. Beiträge zur Geschichte der Stärke und der Verwandlungen derselben. Liebigs Ann. d. Chem. 199 (165).
- Brücke*. Physiologie 4 Aufl. (88).
- Bruckner*. 1883. Monatshefte f. Chem. 4 (889). Cytow. wedł. Samec (27 p. 39).
- Brunswik H.* 1911. Der Harn u. s. w. Berlin (471).
- 1922. Der mikrochem. Nachweis d. Phytosterine u. von Cholesterin als Digitonin -Steride. Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. 36 (316). 1923 Ueber den eindeutigen makro-u. mikrochemischen Nachweis des Histidins am Eiweisskomplex. Zeitschr. physiol. Chem. 127 (268).
- Buscalioni L.* 1898. Der Sudan III und seine Verwendungen in der bot. Mikrotechnik. Bot. Zentralbl. 76 (398).
- Bütschli*. 1896. Ueber die Herstellung künstlicher Stärke. Bot. Zentralbl. 68 (213).
- Chałubiński T.* 1849. Wykład początków botaniki A. de Jussieu. (2).
- Chodat R.* 1910. Darstellung von Oxydasen und Katalasen tierischer und pflanzlicher Herkunft. Abderhaldens Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden 3 (42).
- Chodat R. und Bach A.* 1903. Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. Ber. d. deut. chem. Gesell. 36 (607).
- Chodat R. und Staub W.* Arch. sc. phys. et nat. Genève 4 (265). Cytow. wedł. Abderhaldens E. Biochem. Handlexikon 5 (640).
- Classen A.* 1906. Handbuch d. qualität. Analyse. 6 Aufl. Stuttgart (308).
- Correns C.* 1894. Ueber die vegetabilische Zellmembranen. Jahrb. f. wiss. Bot. 26 (600).
- Czapek F.* 1903. Biochemie der Pflanzen. Jena. 1 (402, 709). 1919. Zum Nachweis von Lipoiden in Pflanzenzellen. Ber. d. deut. bot. Gessel. 37 (207).
- Doroszewski und Rakowski.* 1907. Journ. d. russ. chem.-physikal. Gesell. 39 (427).
- Ehrlich P.* 1883. Ueber eine neue Harnprobe. Charité—Ann. 8 (144).
- Emich F.* 1893. Zum mikrochemischen Nachweis des Schwefels. Zeitschr. analyt. Chem. 32 (163).
- Euler H.* 1908. Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie 1 (38).
- Evard H.* 1928. Contribution à l'étude des ferments oxydants. Thèse. Genève.
- Fehling*. 1848. Arch. f. physiol. Heilkunde (64).
- Fernbach A.* 1904. Quelques observations sur la composition de l'amidon de pommes de terre. C. r. 138 (428).
- Fischer E.* 1890. Synthesen in der Zuckergruppe. Ber. d. deut. chem. Gesell. 23 (2114).
- Flückiger F.* 1871. Ann. de Chim. et de Phys. (145). Cyt wedł. Samec. ('27 p. 6).



- Flückiger F. und Tschirch A.* 1885. Grundlagen der Pharmakognosie, Berlin (237).
- Friedrich O.* 1914. Arch. f. Chemie (Kemi) Min. Geol. 5 Nr. 2 (1). 1923. Chem. Ber. 56 (857).
- Fritsche.* 1834. Ann. de Phys. u. Chem. 22 (129). Cytow. wedł. Samec ('27 p. 87).
- Fürth O.* 1899. Habilitationsschrift. Strassburg.
- Gatin-Grużewska Z.* 1908. C. r. Soc. de Biol. 64 (178). 1908. Sur la composition du grain d'amidon C. r. 146 (540). 1911. Quelques propriétés caractéristiques de l'amylose et de l'amylopectine. C. r. 152 (785); 153 (785). 1912. L'amylose et l'amylopectine. Journ. de Physiol. et Pathol. général 14 (7, 32).
- Gola G.* 1902. Lo zolfo e i suoi composti nell'economia delle piante. Malpighia 16 (368).
- Goldschmiedt.* 1910. Zeitschr. physiol. Chem. 65 (389); 67 (194).
- Grandi V. et Mainini C.* 1900. Sur une réaction colorée qui permet de relever les sels de calcium déposés dans les tissus organiques. Arch. ital. de Biol. 34 (73).
- Grimbert L.* 1903. Recherche de petites quantités de maltose en présence du glucose. Journ. de Pharm. et de Chim. 17 (225).
- Grochowski W.* Elajoplasty w nasionach oleistych (praca jeszcze niedrukowana).
- Grüss J.* 1895. Die Diastase im Pflanzenkörper Ber. d. deut. bot. Gesell. 13 (2)
- Guggenheim M.* 1924. Die biogenen Amine. 2 Aufl. (145. 205).
- Guilliermond A.* 1912. Recherches cytologiques sur le mode de formation de l'amidon et sur les plastes de végétaux. Arch. d'anatom. microscop. 14 (309).
- Hansen A.* 1885. Ueber Sphärokristalle. Arb. aus dem bot. Institut Würzburg 3 (95).
- Hartig Th.* 1858. Entwicklungsgeschichte des Pflanzenkeims (154).
- Haushofer K.* 1885. Mikroskopische Reaktionen. Braunschweig.
- Herzfeld E. und Klinger R.* 1920. Zur Chemie der Polysaccharide, Biochem. Ztschr. 107 (268); ibidem 112 (55).
- Hoffman R.* 1853. Reaktion auf Leucin u. Tyrosin. Liebigs Ann. d. Chem. und Pharm. 87 (123).
- Hoppe-Seyler.* 1924. Physiologisch und pathologisch chemische Analyse. Berlin. 9 Aufl.
- Humbert E.* Journ. de Pharm. et de Chim. 3 Sér. 28 (272).
- Hunter R.* 1923. Proteins reactions (With special reference to egg. albumin). Chemical News. London 127 (134).
- Ilosway - Lunge.* 1889. Zeitschr. f. angew. Chem. (666).
- Inoye K.* 1912. Ueber die Xanthoproteinreaktion. Zeitschr. physiol. Chem. 81 (80).
- 1913. Ueber den Nachweis des Histidins. Zeitschr. physiol. Chem. 83 (79)
- Jaeger C.* 1909. Arch. f. pathol. Anat. 198 (62).
- Jentys S.* 1907. O istocie chemicznej i budowie skrobi. Bull. de l'Acad. de Sc. de Cracovie (203). Roczniki nauk rolniczych. 3 (291).

- Jones B.* 1848. Ueber einen neuen Körper aus dem Harn eines an Knochen-  
erweichung leidenden Mannes. *Ann. der Chem. u. Pharm.* 67 (102).
- Kandelaki K.* O sodierzanji azota w kamedy smolach. *Farm. Żurn.* 39 (273).  
Cytow. wedł. Ossowski ('27 p. 22).
- Kantorowicz J.* 1912. *Chem. Zentralbl.* 2 (1248).
- Karrer P.* 1920. Beitrag zur Konstitution und Konfiguration der Glukoside.  
*Helv. chim. acta* 3 (258); 1921. *ibidem* 4 (811); 1922. *Ber. d. deut. chem.*  
*Gesell.* 55 (2854).
- 1923. Zur Kenntnis polymerer Kohlenhydrate. *Helv. chim. acta* 6 (402).
- Karrer P. und Bücklin Elisabeth.* 1922. Zur Kenntnis der Amylose. *Helv. chim.*  
*acta* 5 (181).
- Karrer P. und Nägeli C.* 1920. Zur Kenntnis der Polysaccharide. *Helv. chim.*  
*acta* 3 (620); 1921. Ueber den Aufbau der Kartoffelstärke. *ibidem* 4 (169  
185. 263).
- Karrer, Nägeli, Hurwitz und Wälti.* 1921 *Helv. chim. acta* 4 (678).
- Keisermann S.* 1910. Ueber die Hydratation und Konstitution der Portland-  
zements. *Koll. Beih.* 1 (423).
- Kerb J.* 1919. Ueber eine Verbindung der Stärke mit Phosphorsäure. *Biochem.*  
*Zeitschr.* 100 (3).
- Klein G.* 1926. Mikrochemischer Nachweis und Wander des organisch gebun-  
denen Phosphor in der Pflanze. *Planta* 2 (497).
- 1927. Der Mikrochem. Nachweis von organisch gebundenem Schwefel und  
Magnesium. *Oesterr. bot. Zeitschr.* 76 (15).
- 1929. *Praktikum der Histochemie.* Wien u. Berlin (18).
- De Koninck L.* 1831. Neue Reaktion auf Kali. *Zeitschr. f. analyt. Chem.*  
20 (390).
- König J.* 1903. Untersuchungen der menschlichen Nahrungs- und Genuss-  
mittel. Berlin. 4 Aufl. 1 (655).
- Koss.* 1901. *Zieglers Beitr.* 29 (163). Cytow. według Abderhalden E. *Handb.*  
*d. Arbeitsmethoden* 5 T. 2 (444).
- Kostyschew S. und Eliasberg P.* 1920. Ueber die Form der Kaliumverbindun-  
gen in lebenden Pflanzengeweben. *Zeitschr. physiol. chem.* 111 (228).
- Kraemer.* 1902. The structure of the starch grain. *Bot. Gazette* 34 (341).
- Krasser F.* 1886. Untersuch. ü. d. Vorkommen von Eiweiss in d. pflanzlich.  
Zellhaut, nebst Bemerkungen ü. d. mikrochem. Nachweis d. Eiweis-  
skörper. *Sitzber. d. Akad. d. Wissensch. Wien* 94. 1 Abt. (118).
- Kretz F.* 1922. Ueber den mikrochemischen Nachweis von Tryptophan in der  
Pflanze. *Biochem. Zeitschr.* 130 (87).
- Kuhn R.* 1924. Verzuckerung der Stärke durch Emulsin. *Zeitschr. physiol.*  
*Chem.* 135 (12).
- Küster E.* 1897. Die anatomischen Charaktere der Chrysobalanceen, insbeson-  
dere ihre Kieselablagerungen. *Bot. Zentralbl.* 69 (48); *Ber. d. deut. bot.*  
*Gesell.* 15 (136).
- 1913. Ueber die Schichtung der Stärkekörner, *Ber. d. deut. bot. Gesell.*  
31 (339).
- Langlois J. P.* 1897. *C. r. Soc. de Biol.* 49 (524).
- Laskowski N.* 1846. *Liebigs Ann. d. Chem.* 58 (129).

- Leutert.* 1895. *Forsch. d. Med.* 13. Cytow. wedł. Abderhalden E. Handbuch d. Arbeitsmethoden 4 T. 2 (444).
- Lieben.* 1924. Ueber die Nitrierung einiger Eiweisskörper. *Biochem. Zeitschr.* 145 (534).
- Liebermann C.* 1885. Ueber das Oxychinoterpen. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 18 (1804).
- Lilienfeld L. und Monti A.* 1892. Ueber die mikrochemische Lokalisation des Phosphors in den Geweben. *Zeitschr. physiol. Chem.* 7 (410).
- Lintner C. und Düll. G.* 1893. Ueber den Abbau der Stärke unter dem Einflusse der Diastasewirkung. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 26 (2533); 1895. Ueber den Abbau der Stärke durch die Wirkung der Oxalsäure. *ibidem* 28 (1522).
- Lippmann O.* 1887. Ueber einige organ. Bestandteile des Rübensaftes. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 20 (3201).
- 1904. *Chemie der Zuckerarten.* Braunschweig (1499).
- Loew O.* 1892. Ueber die physiologischen Functionen der Calcium- und Magnesiumsalze im Pflanzenorganismus. *Flora* 75 (368); 1903. *ibidem* 92 (489). 1918. Ninhydrin als mikrochemisches Reagens auf Aminosäuren. *Flora* 10 (262).
- Loew O. und Bokorny W.* 1889. Ueber das Verhalt. d. Pflanzenzellen zu stark verd. alkalischer Silberlösung. *Bot. Zentralbl.* 39 (370).
- Macallum A.* 1898. On the detection and localization of Phosphor. *Proc. Roy. Soc.* 63 (474).
- 1899. *Transact. Canadian Inst.* 6 (439).
- 1905. On the distribution of Potassium in Animal and vegetable Cells. *Journ. of Physiolog.* 32 (95).
- Maltitano G.* 1906. Les matières amylacées étudiées à l'aide de nos connaissances sur l'état colloïdal. *C. r.* 143 (400).
- Maltitano G. et Catoire M.* 1922. L'amylocellulose considérée comme composée d'acide silicique et d'amylose. *C. r.* 174 (1128).
- 1928. Zum Micellarzustand der Stärke. *Kolloid. Z.* 46 (3); *Ber. ü. gesam. Physiol.* 48 (463). 1929. Ref.
- Mangham S.* 1911. *New Phytologist* 10 Nr. 5. 6 (160).
- Maquenne L.* 1904. Sur la formation et la saccharification de l'amidon rétrogradé. *C. r.* 138 (213); Sur la nature de la fécule crue. *ibidem* (375), *Ann. de Chim.* 2 (109).
- 1906. *Bull. de la Soc. Chim.* 3 (35). 1908. *C. r.* 146 (317, 542).
- Maquenne L. Fernbach A. et Wolff I.* 1904. Rétrogradation et coagulation de l'amidon. *C. r.* 138 (49).
- Maquenne L. et Roux E.* 1906. *Ann. de Chim.* 9 (179).
- Massol L.* 1911. Action des radiations ultraviolettes sur l'amidon. *C. r.* 152 (902).
- Mazurkiewicz W.* 1925. Projekt słownictwa anatomo-botanicznego. Warszawa. (29).
- 1926. L'analyse chimique de l'oleoleucite. *Extr. de C. r. Soc. de Biolog.* 45 (1201).

- Mesnard E.* 1893. Recherches sur la localisation des huiles grasses dans la germination des grains. C. r. 116 (111).
- Meyer A.* 1886. Bildung der Stärkekörner in den Laubblättern aus Zuckerarten u. s. w. Bot. Ztg. 44 (81).
- 1895. Untersuchungen über die Stärkekörner. Jena.
- 1920. Analyse der Zelle. Jena (483).
- Michlin D.* 1926. Weiteres über pflanzliche Oxydoreduktase. Biochem. Zeitschr. 185 (216). 1928. ibidem 202 (329).
- Miliarakis S.* 1884. Die Verkieselung lebender Elementarorgane bei den Pflanzen. Diss. Würzburg. Cytow. wedł. Küster ('97).
- Millon E.* 1849. Sur un réactif propre aux composés protéiques. C. r. 28 (40). 1850. Ann. de Chim. et Phys. 3 sér. 29 (507).
- Mitscherlich C.* 1837. Pogg. Annal. 40 (106).
- Molisch H.* 1891. Grundriss einer Histochemie d. pflanzlichen Genussmittel Jena (10).
- 1916. Beitr. z. Mikrochemie. Ber. d. deut. bot. Gesell. 34 (288, 357).
- 1923. Mikrochemie der Pflanze. Jena.
- Möller H.* 1888. Anatomische Untersuchungen ü. das Vorkommen der Gerbsäure. Ber. d. deut. bot. Gesell. 6 (66).
- Monteverde N.* 1890. Ueber die Ablagerung von Calcium und Magnesium in der Pflanze. Bot. Zentralbl. 43 (327).
- Mörner C.* 1914. Eine wohlcharakterisierte, organ. Schwefelverbindung, erhalten aus Proteinstoffen bei Behandlung derselben mit Salpetersäure, Zeitschr. physiol. Chem. 93 (175).
- 1919. Welchen Anteil haben Tyrosin u. Tryptophan an den beiden Phasen der Xanthoproteinsäurereaktion. Zeitschr. physiol. Chem. 107 (203).
- Mulder.* 1837. Pogg. Ann. 40 (253).
- 1839. Journ. of prakt. chem. 16 (297).
- 1840. Berzelius Jahresb. (649).
- Müller-Thurgau H.* 1882. Ueber das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen Landwirt. Jahrb. 9 (168); ibidem 15 (445. 505).
- Münther,* 1845. Bot. Ztg. 3 (193). Cytow. wedł. Samec ('27 p. 87).
- Musculus F.* 1879. Ueber die Modificationen, welche die Stärke in physikalischer Hinsicht erleidet. Bot. Ztg. 37 (345).
- Nadson G. et Rochlin.* 1928. Sur la transformation des grains d'amidon en cristaux d'oxalate de calcium dans les cellules végétales sous l'action des rayons ultraviolets. C. r. de Soc. de Biol. 99 (231).
- Nägeli C.* 1858. Die Stärkekörner. Cytow. wedł. Zwickera (8).
- Nägeli W.* 1874. Beitr. zur näheren Kenntnis der Stärkegruppe. Leipzig. (106). Cyt. wedł. Samec ('27 p. 3).
- Nasse O.* 1879. Ueber die arom. Gruppe in Eiweissmolecul. Ber. ü. d. Sitz. der Naturforsch. Gesell. zu Halle. Sitz. 8 März.
- Neuberg C.* 1908. Enzymatische Umwandlung von Adrenalin. Biochem. Zeitschr. 8 (383). Arch. f. pathol. Anat. 192 (514).



- Neuberg C. und Mandel J.* 1915. Ueber ein einfaches Verfahren zur Erkennung u. Bestimmung von Metalloiden in organisch. Verbindungen. *Biochem. Zeitschr.* 71 (196).
- Neumann E.* 1916. Fenol som Klarmiddel. *Bot. Notiser* (197).
- Nickel E.* 1890. Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen. Berlin. 2 Aufl. (7).
- Nortrop J. und Nelson J. M.* 1916. *Journ. of the Americ. chem. Soc.* 38 (472). Cytow. wedł. Samec ('27 p. 21).
- Ollson U.* 1921. Die Vergiftung der Amylase durch Schwermetalle und organische Stoffe. *Zeitschr. physiol. Chem.* 114 (63).
- Osborn Th.* 1910. Die Pflanzenproteine. *Ergebn. d. Physiol.* 10 (47). Wiesbaden.
- Ossowski A.* 1928. Studja nad powstawaniem olejków, balsamów i żywic. Praca doktorska. Warszawa.
- Pałladin W.* 1883. O wnutrinnom strojenji i sposobie uołoszczenia kletocznoj obołoczki krachmalnego ziarna. *Uczenija zapiski Moskowskiego Uniwersiteta.*
- 1893. *Anatomja rastienij.* Warszawa. (46).
- Pauly H.* 1904. Ueber die Konstitution des Histidins. *Zeitschr. physiol. Chem.* 42 (508).
- Pauly W. und Stenziger Th.* 1929. Ueber die Löslichkeitsbeeinflussung schwerlöslicher Kalksalze durch Eiweisskörper u. über Kohlensäureverbindung der Proteine. *Biochem. Zeitschr.* 205 (71).
- Pawlewski Br.* 1897. Ueber die Unsicherheit der Guajakreaktion auf wirksame Diastase. *Ber. d. deut. chem. Gesell.* 30 (1313).
- Pfeiffer H.* 1928. Ueber Methoden zum Studium der Verkieselungsprozesse innerhalb lebender pflanzlicher Zellen. *Arch. exper. Zellforschung* 6 (418). *Ber. ü. die gesam. Physiol.* 48 (501). 1929. Ref.
- 1930. Ueber den Mechanismus der Abscheidung von  $\text{SiO}_2$  — Gallerten in Pflanzen. *Protoplasma* 9 (120).
- Pfeffer W.* 1872. Untersuchungen über d. Proteinkörner u. d. Bedeutungen d. Asparagins beim Keimen der Samen. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 8 (429).
- Péterfi T.* 1928. *Methodik der wissenschaftlichen Biologie. 2. Allgemeine Physiologie.* Berlin (1973).
- Pictet A.* 1918. Sur la transformation de la lévoglucosan en dextrine. *Helv. chim. acta* 1 (226).
- Pictet A. und Castau P.* 1920. Glukosan. *Helv. chim. acta* 3 (645).
- Pictet A. et Sarasin, J.* 1918. Sur la distillation de la cellulose et de l'amidon sous pression réduite. *Helv. chim. acta* 1 (87).
- 1918. *C. r.* 166 (38).
- Piotrowski G.* 1857. *Sitzber. d. Akad. d. Wissensch. Cl. mat. nat. Wien.* 24 (335).
- Polacci.* 1894. Ueber die Verteilung des Phosphors in den Pflanzlichen Geweben. *Malpighia* 8 Sep.
- 1895. Ueber die mikrochem. Prüfung auf Phosphor vermittels des Molybdänreagens u. s. *Malpighia.* 9 (370).

- Pollack and Herbert.* 1928. Calcium ions in living protoplasm. Journ. of gen. physiol. 11 (539). Ber. ü. d. wiss. Biolog. 9 (139). 1929. Ref.
- Polak F. und Tychowski A.* 1929. Beiträge zur Chemie der Stärke vom diastatischen Standpunkt aus betrachtet. Biochem. Zeitschr. 214 (216).
- Van der Prants.* 1849. Jahresb. u. d. Fortsch. d. Chem. 2 (507).
- Pringsheim H. und Langhans A.* 1912. Ueber krystallinische Polysaccharide aus Stärke. Ber. d. deut. chem. Gesell. 45 (2533).
- Pringsheim A. und Eisler F.* 1913. Beiträge zur Chemie der Stärke, ibidem 46 (2959).
- 1914. ibidem 47 (2565).
- Pringsheim H. und Lichtenstein Stefanie.* 1916. Ueber krystallisierte Polysaccharide aus Glykogen. Ber. d. deut. chem. Gesell. 49 (346).
- Pringsheim H. und Persch W.* 1921. Ueber die Methylierung der Polyamylosen. Ber. d. deut. chem. Gesell. 54 (3162).
- 1922. Ueber Methyl- und Acetylprodukte der Polyamylosen. ibidem 55 (1425).
- Pringsheim H. und Dernikos D.* 1922. Weiteres über Polyamylosen. Ber. d. deut. chem. Gesell. 55 (1433).
- 1924. Ueber die Haloverbindungen der Polyamylosen. ibidem 57 (1579).
- Raciborski M.* 1893. Kritisches Referat über die Arbeit von Lilienfeld und Monti. Bot. Ztg. 51 (245).
- 1894. Elajoplasty liljowatych. Rozpr. Wydz. Matem. przyrodn. Akadem. Umiejętności w Krakowie. Odbitka (2).
- 1905. Utleniające i redukujące własności komórki żywej. Bull. de l'Acad. des Sc. de Cracovie. (338; 671).
- 1906. Zapiski mikrochemiczne. Ueber die Nitrit und Diasoreaktion. Bull. de l'Acad. des Sc. de Cracovie (553).
- Ransom.* 1912. New York med. journ. 8 (407).
- Reichert E. T.* 1913. The differentiation and specificity of starches in relation to genera, species, etc. Washington.
- Revald B.* 1929. Ueber das Vorkommen von Phosphatiden in Kartoffeln u. s. w. Biochem. Zeitschr. 216 (11).
- Richter O.* 1902. Untersuchungen über das Magnesium u. seine Beziehungen zur Pflanze. Sitzber. Wiener. Akadem. 111 (171).
- Ritthausen.* 1868. Reaktion auf Proteinstoffen. Zeitschr. analyt. Chem. 7 (266).
- 1872. Die Eiweisskörper d. Getreidearten, Hülsenfrüchte u. Oelsamen. Bonn.
- Romieu M.* 1925. Sur une réaction chimique nouvelle des matières protéiques sèches applicables à l'histochemie. C. r. 180 (875).
- Rose F.* 1883. Pogg. Annal. 28 (132).
- Rosenthaleh L.* 1907. Vanillinsalzsäure als Reagens auf Eiweiss und Tryptophan. Apoth. Ztg. 22 (678).
- 1928. Applied phyto-mikrochemistry. Amer. Journ. of Pharmacy 100 (2).
- 1928. Grundzüge der chemischen Pflanzenuntersuchung. 3 Aufl. Berlin (143).

- Roux E. 1905. Sur la transformation de l'amylocelulose en amidon. C. r. 140 (440. 1259. 1303).
- 1905. Bull. d. l. Soc. Chim. 3 (33. 471. 723. 788).
- 1906. C. r. 142 (15).
- Ruhemann S. 1910. Transaction of the Chemical Soc. 97 (2025).
- Runge. 1928. Jahrb. d. Chem. u. Pharm. 3 (115).
- Sachs J. 1859. Ueber eine neue mikroskop. chem. Reaktionsmethoden. Sitzber. Münchener Akad. (8). 1862. Flora (289).
- Sakaguchi S. 1925. Ueber eine neue Farbenreaktion von Protein und Arginin Journ. Biochemistry 5 (25). Chem. Zentralbl. 2 (1547). Ref.
- Salomon. 1914. Journ. of. wiss. bot. 54. Cytow. wedł. Abderhalden E. Handb. d. Arbeitsmethoden 5. 2 (444).
- Samec M. 1914. Die Verschiebung des Phosphorgehaltes bei den Zustandsänderungen und dem diastatischen Abbau der Stärke. Kol. Beih. 6 (23).
- 1919. Kol. Beih. 10 (289).
- 1927. Kolloidchemie der Stärke. Dresden u. Leipzig.
- 1928. Ueber die Verteilung von Phosphor und Stickstoff innerhalb des Stärkekorns. Biochem. Zeitschr. 195 (72).
- Samec M. und Antonowić Zorka. 1927. Ueber Peptisation der Stärke durch Ultraviolette Strahlen. Koll. Beih. 23 (377).
- Sanio C. 1863. Einige Bemerkungen über den Gerbstoff und Seine Verbreitung bei den Holzpflanzen, Bot. Ztg. 21 (17).
- Sarasin J. 1918. Arch. Sc. Phys. et Natur. 46 (5).
- Scaki L. 1922. Zeitschr. f. d. gesam. experim. Med. 28 (273).
- Schardinger F. 1904. Azetongärung. Wiener Klin. Woch. 17 (207).
- 1905. Bacillus macerans, ein Aceton bildender Rottebacillus. Zentralbl. f. Bakt. 2 Abt. 14 (772).
- 1907. ibidem 19 (161); 1909. ibidem 22 (98). 1911. ibidem 29 (188).
- Scherer. 1857. Journ. of prakt. Chem. 70 (406).
- Schiff H. 1896. Biuretreactionen. Ber. d. deut. chem. Gesell. 29 (298).
- Schimper A. 1880. Untersuchung über die Entstehung der Stärkekörner. Bot. Ztg. 38 (883).
- 1881. Untersuchungen über das Wachstum der Stärkekörner. Bot. Ztg. 39 (184. 201. 217). Ueber die Struktur der Stärkekörner. ibidem (841).
- 1890. Zur Frage der Assimilation der Mineralsalze durch die grüne Pflanzen. Flora 73 (213).
- Schujeninoff S. 1897. Zur Frage der Kalkablagerung in den quergestreiften Muskeln. Zeitschr. f. Heilkunde 18 (79).
- Sentt E. 1904. Ueber den mikrochem. Zuckernachweis durch essigsäures Phenylhydrazin. Sitzber. d. Kais. Akad. Wiss. Wien. 113. Abt. 1 (3).
- Sponsler O. L. 1920. Journ. of. Gen. Phys. 5 (757). Cytow. wedł. Samec. ('27 p. 85).
- Staub W. 1908. Nouvelles recherches sur la tyrosinase. Travaux de l'Inst. bot. l'Univers. Genève. 8 Sér. 1.

- Strasburger E.* 1913. Das botanische Praktikum. 5 Aufl. Jena.
- Streng A.* 1884. Ueber eine neue mikroskop.-chem. Reaktion auf Natrium. Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. 1 (129).
- Syniewski W.* 1898. Ber. d. deut. chem. Gesell. 30 (2415).
- 1899. Ueber die Constitution der Stärke. Liebigs Ann. d. Chem. 309 (282). 1902. ibidem (201, 212).
- 1902. Ueber die Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke und über eine Jodverbindung des Amylodextrins. Liebigs Ann. d. Chem. (201, 212).
- Tanret Ch.* 1914. Sur la pluralité des amidons. C. r. 158 (1353). Sur la pluralité des amyloses. C. r. 159 (530).
- 1915. Bull. Soc. chim. 17 (83).
- Thomas.* 1914. Bioch. Bull. 3 (403).
- Tichomirow W.* 1900. Uczebnik farmakognozi (501).
- Tollens B. und Wheler H.* 1889. Ueber die Xylose oder den Holzzucker, eine zweite Penta-Glycose. Liebigs Ann. d. Chem. 254 (304).
- Tillmans J., Hirsch P. und Stoppel F.* 1928. Ein neues Verfahren zur Bestimmung von Tryptophan und Tyrosin in Proteine durch die quantitative Ausgestaltung der Xanthoproteinreaktion und dessen Anwendung u. s. w. Biochem. Zeitschr. 189 (379).
- Tunmann O.* 1909. Untersuchungen über die Aleuronkörner einiger Samen. Pharm. Zentralhalle 50 (525).
- 1912. Zur Mikrochemie u. Mikrosublimation einiger Methanderivate. Apoth. Ztg. Nr. 99 (100).
- Vauquelin.* 1828. Jahrb. d. Chem. u. Pharm. 3 (115).
- 1869. Sitzber. Akad. d. Wissensch. Wien. 602 Abt. (276).
- Vintschgau.* 1869. Sitzber. Akad. d. Wissensch. Wien 60. 2 Abt. (276).
- De Vries.* 1885. Bot. Jahresber. 1 (122). Cyt. wedł. Samec ('27 p. 4).
- Weiss M.* 1919. Ueber die quantitativen Nachweis des Tyrosins mittels der Milonschen Reaktion. Biochem. Zeitschr. 79 (170).
- Wiesner J.* 1877. Oesterr. bot. Zeitschr. Nr. 1. Cytow. wedł. Schimper (80).
- 1928. Die Rohstoffe des Pflanzenreiches. Leipzig 2 (1933).
- Willstätter R.* 1910. Untersuchungen über Chlorophyll. Ann. d. Chem. 378 (18).
- 1928. Untersuchungen über Enzyme, Berlin 1 (251).
- Winkel M.* 1905. Anwendung der Vanillinsalzsäurereaktion zum Nachweis von Fermenten. Apoth. Ztg. 20 (209).
- Windaus A.* 1909. Ueber die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. Ber. d. deut. chem. Gesell. 42 (238).
- 1910. Ueber die quantitative Bestimmung des Cholesterins u. s. w. Zeitschr. physiol. Chem. 65 (110).
- Wisselingh C.* 1915. Ueber den Nachweis des Gerbstoffes in der Pflanze u. s. w. Beih. z. bot. Zentralbl. 32. 1 Abt. (155).
- Wohlgemut J.* 1913. Grundriss der Fermentmethoden. Berlin (261).
- Woker Gertrude.* 1917. Die Theorie der Benzidinoxidation in ihrer Bedeutung für Peroxydase Untersuchungen. Ber. d. deut. chem. Gesell. 50 (672).



- Wróblewski A.* 1897. Ber. d. deut. chem. Gesell. 30 (2108).
- Zimmermann A.* 1890. Beitrag z. Morph. u. Phys. des Pflanzenreiches. Cytow. wedł. Samec ('27 p. 87).
- 1892. Die bot. Mikrotechnik. Tübingen (52).
- Zulkowski K.* 1880. Verhalten der Stärke gegen Glycerin. Ber. der deut. chem. Gesell. 13 (1395).
- 1890. Studien über Stärke. Ber. d. deut. chem. Gesell. 23 (3295).
- Zwicker J.* 1921. L'action des enzymes amylolytiques sur les grains d'amidon naturels et la structure colloïdale de l'amidon. Recueil des trav. bot. néerl. 18 (1).
-

## OBJAŚNIENIA RYSUNKÓW W TABLICY.

## TABLICA I.

Rys. 1. *Reakcja na potas w komórce:*

a — przy ziarnach skrobi amyloplasty z kryształami azotynu kobalto-wo-potasowego;

b — ziarno skrobi z kryształami azotynu kobalto-wo-potasowego.

Rys. 2. Przekrój przez ziarno skrobi, po utlenieniu bromem, z takiemiż kryształami.

Rys. 3. Ziarno skrobi i amyloplast — a' z kryształami chloroplatynianu potasu.

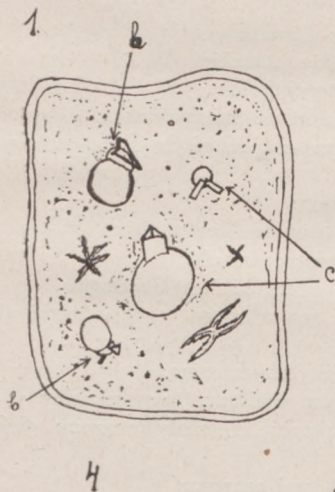
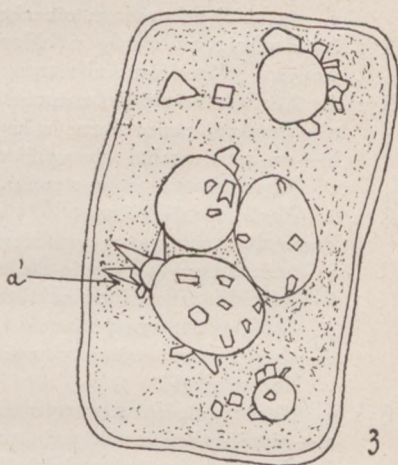
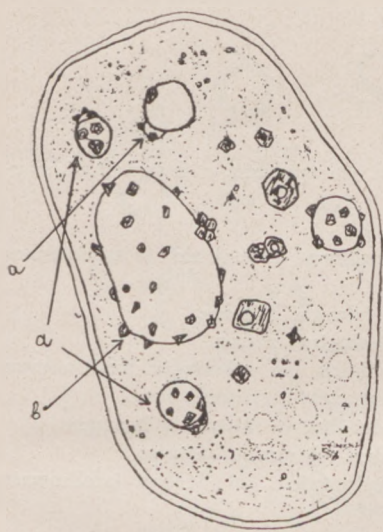
Rys. 4. *Reakcja na magnez:*

b — amyloplasty z kryształami fosforanu amonowo-magnezowego,

c — ziarna skrobi z kryształami.

Rys. 5. Otoczki ziaren skrobi po spaleniu z kryształami fosforanu amonowo-magnezowego (reakcja na magnez).

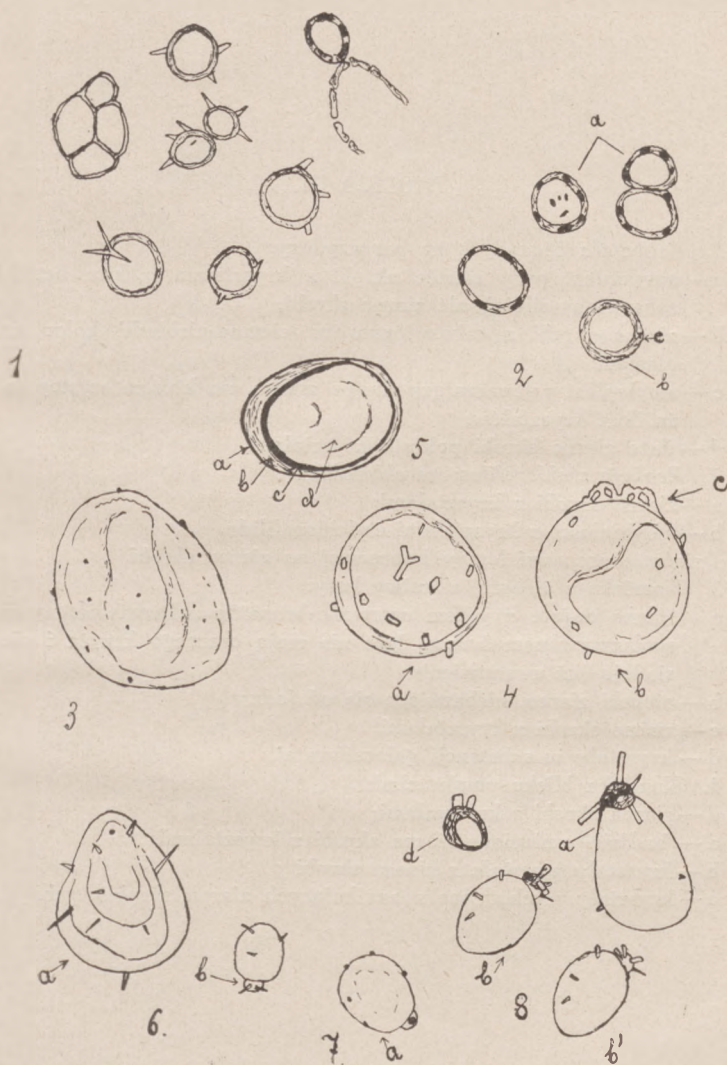
Rys. 6. Reakcja na magnez po utlenieniu bromem, kryształy fosforanu amonowo-magnezowego.



## TABLICA II.

- Rys. 1. *Reakcja na wapń*: otoczki ziaren, po spaleniu, z kryształami siarczanu-wapnia.
- Rys. 2. *Reakcja na krzem*:  
a — otoczki ziaren, po spaleniu, z grudkami krzemionki, w odczynniku Küstera;  
b — przekrój przez ziarno skrobi w odczyn. Küstera;  
c — mocniej zabarwiona otoczka, niż wnętrze ziarna.
- Rys. 3. *Reakcja na siarkę* z chlorkiem baru, po utlenieniu dwutlenkiem wodoru, na powierzchni ziarna drobny strął siarczanu baru.
- Rys. 4. *Reakcja na siarkę*, z azotanem strontu, po utlenieniu bromem:  
a — przekrój przez ziarno z kryształami siarczanu strontu;  
b — na powierzchni ziarna i w amylopląście (c) drobne tafelkowate kryształy siarczanu strontu.
- Rys. 5. *Reakcja na białko*:  
Przekrój przez ziarno w odczynniku dwuazowym:  
a — czerwone zabarwienie na obwodzie otoczki;  
b — otoczka zabarwiona na słabo-różowy kolor;  
c — wewnętrzna część otoczki bardzo silnie zabarwiona;  
d — bezbarwne wnętrze ziarna z 2 zabarwionymi na słabo-różowy kolor smugami.
- Rys. 6. *Reakcja na fitosterynę* z digitoniną:  
a — ziarno skrobi z kryształami digitonino-fitosterydu;  
b — kryształy w amylopląście i na ziarnie skrobi.
- Rys. 7. *Reakcja na cukry redukujące* z odczynnikiem Fehlinga:  
a — ziarnka tlenku miedziawego w zewnętrznej części otoczki ziarna i w amylopląście.
- Rys. 8. *Reakcja na związany cukier* z fenylohydrazyną:  
a — w amylopląście kryształy osazonu maltozy, rozpuszczalne w acetonie (1:1), na powierzchni skrobi kryształy osazonu glukozy nierozpuszczalne w acetonie;  
b — ziarno z amyloplastem z kryształami osazonu;  
b' — to samo ziarno w acetonie; pozostały tylko kryształy osazonu glukozy;  
d — amyloplast z kryształami osazonu i ziarnem skrobi.





## TABLICA III.

Rys. 1. *Reakcja z benzydynam na peroksydazy:*

- a — amyloplast przy ziarnie skrobi z kryształem błękitu benzydyny zabarwiony silniej, niż ziarno skrobi;
- b — ziarno skrobi z zaharwionym na ciemno-niebieski kolor amyloplastem;
- c — amyloplast wytwarzający drugie ziarno, na którym występuje duża ilość kryształów;
- d — duże ziarno skrobi pokryte kryształami.

Rys. 2. *Reakcja z chlorofilem na chlorofilazę:*

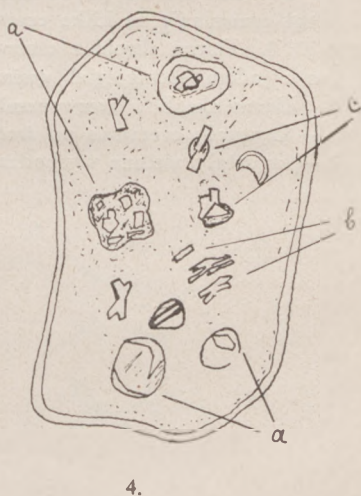
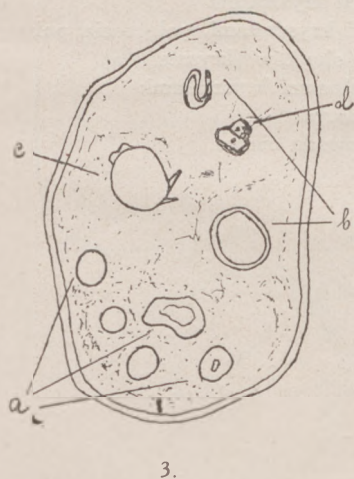
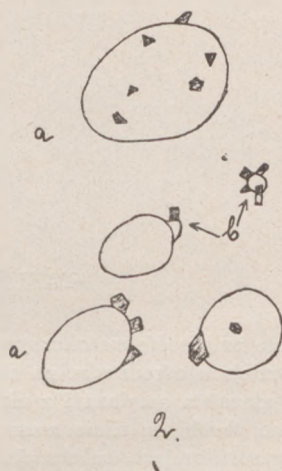
- a — ziarno skrobi z kryształami;
  - b — amyloplasty z kryształami etylchlorofilidu.
- Działanie promieni lampy kwarcowej na ziarna skrobi.*

Rys. 3. Komórka z głębszej warstwy kory:

- a — ziarna dające z jodem czerwono-brunatne zabarwienie, w świetle spolaryzowanym świecą, lecz nie mają czarnego krzyża i nie posiadają już uwarstwienia;
- b — otoczki ziaren, niebarwiące się od jodu;
- c — ziarno skrobi z kryształami;
- d — kryształy w substancji galaretowatej.

Rys. 4. Komórka blisko powierzchni:

- a — ziarna skrobi z kryształami;
- a' — bardziej zmienione ziarna skrobi z kryształami;
- b — kryształy powstałe z ziaren skrobi ;
- c — kryształy wychodzące z zanikających ziaren skrobiowych.

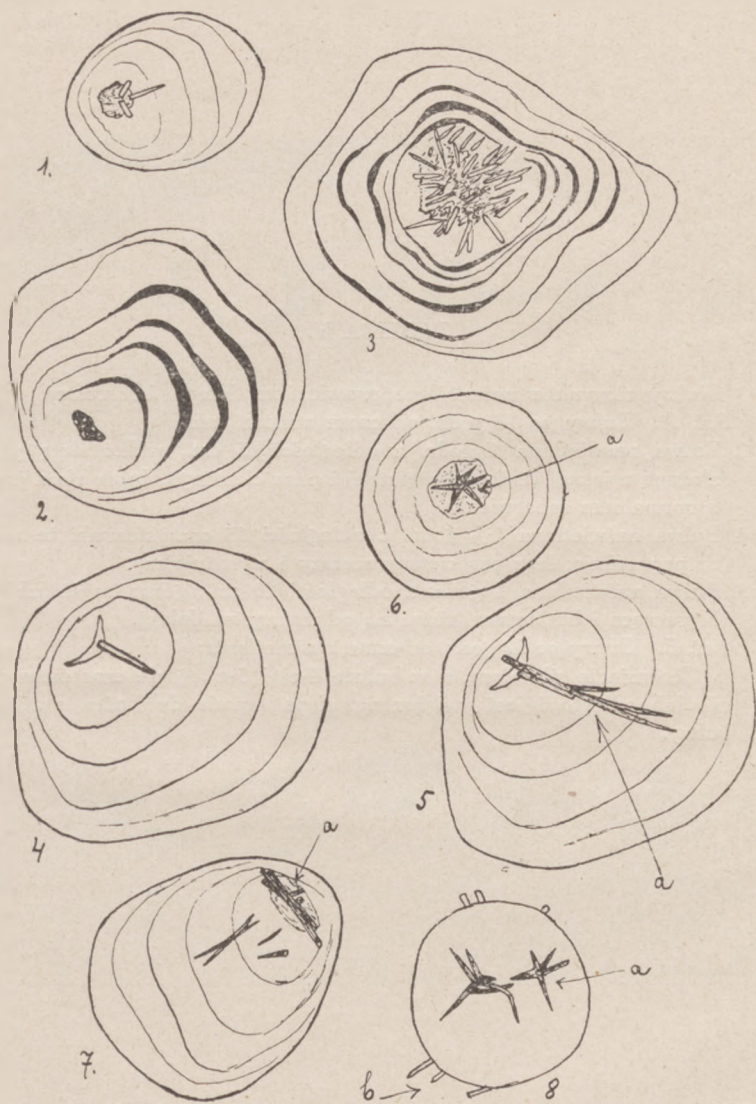


## TABLICA IV.

*Działanie na skrobię metalicznym potasem w alkoholu absolutnym.*

- Rys. 1. W miejscu ośrodeczka na ziarnie skrobi powstaje jama, uwidocz-  
nia się ziarnista amyloza i z niej wyrastają kryształ.
- Rys. 2. Ziarno skrobi, z silnie zaznaczonem uwarstwieniem, warstwy sze-  
rokie, przeświecające, substancja wypełniająca je uległa rozpuszczeniu.
- Rys. 3. Ziarno z kryształami wychodzącymi z naruszonego wnętrza ziarna.
- Rys. 4. Ziarno z kryształem, preparat w alkoholu absolutnym.
- Rys. 5. To samo ziarno po dodaniu nalewki jodowej: bezbarwny kryształ  
uległ przemianie na kilka czerwonych kryształów.
- Rys. 6, 7, 8. Ziarna skrobi z czerwonymi kryształami, połączenia poliamy-  
loz z jodem, formy igieł, gwiazdek, słupków (kryształy a).
- Rys. 8. Ziarno skrobi z czerwonymi i zielonymi kryształami:  
a — kryształy czerwone po środku ziarna;  
b — kryształy zielone wychodzą z obwodu ziarna.





## TABLICA V.

*Bulwy ziemniaka nasświetlone promieniami lampy kwarcowej.*

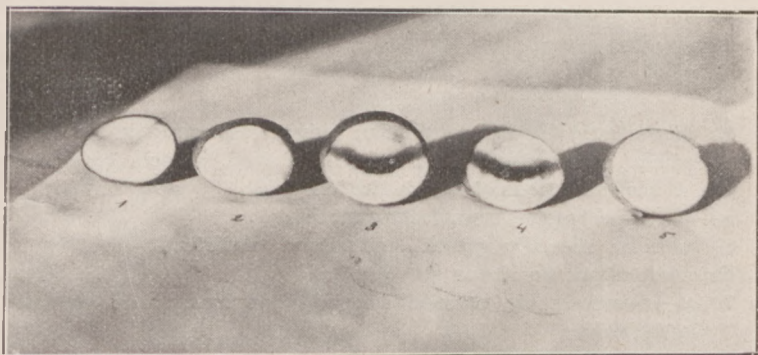
*Fot. A. Bulwy po 18 godz. od czasu nasświetlenia.*

- 1 i 2. Bulwa nasświetlana 1 godz. z odległości 15 cm., widać sferę górną złożoną z jasnej części zewnętrznej i pasa ciemnego, dolna sfera jasna, o normalnem zabarwieniu.
- 3 i 4. Bulwa nasświetlona  $1\frac{1}{2}$  godz. z odległości 15 cm.; stosunki te same co poprzednio, lecz pas ciemny szerszy i wyraźniejszy.
5. Bulwa nasświetlona 1 godz. z odległości 10 cm.; górna część szklista, błyszcząca i bezbarwna, różni się od mączystej dolnej.

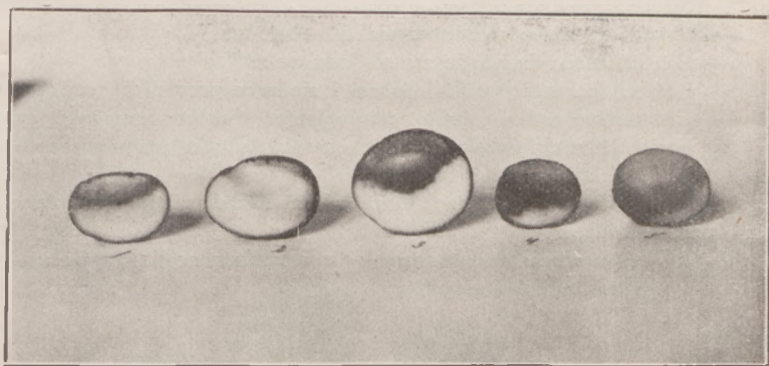
*Fot. B. Bulwy po 72 godz. od czasu nasświetlenia:*

Zczernienie silniejsze, a w bulwie 4-ej i 5-ej, gdzie czas nasświetlania lub odległość jest zwiększona, sięga prawie do końca przekroju bulwy.

A.



B.



## TABLICA VI.

- Rys. 1. *Ziarna naświetlone promieniami lampy kwarcowej, w wodzie:*  
a — silnie zaznaczone na ziarnie warstwy i z pod amylopektyny w miejscach pęknięć prześwieca amyloza;  
b — amylopektynowa zewnętrzna otoczka;  
c — ostroma ziarna w postaci podłużnych prążków.  
*Działanie zimna na ziarna skrobi.*
- Rys. 2. a — tworzenie się pęknięć i początek rozpuszczania amylozy od ośrodeczka;  
b — ziarno z podniesioną pęcherzykowatą otoczką nad częściowo rozpuszczonem wnętrzem;  
b' — rozpuszczona część otoczki;  
c — resztki otoczki-amylopektyny nad rozptywajacem się wnętrzem-amylozą.
- Rys. 3. Rozpuszczanie się ziaren od obwodu i zachowanie się amyloplastów:  
a — ziarna ulegające rozpuszczeniu od obwodu;  
b — resztki ziaren, barwiące się od jodu na żółto;  
c — z ziaren pozostały tylko otoczki i siedzące przy nich amyloplasty;  
d — w komórce zostały tylko amyloplasty, niektóre wewnątrz puste, ponieważ znajdująca się w nich skrobia uległa rozpuszczeniu.
- Rys. 4. *Działanie zimna wobec jodu:*  
a — ziarno skrobi z zielonemi kryształami kształtu igieł i słupków po 24 godzinach;  
b — ziarna skrobi z czerwonymi — c i bezbarwnymi kryształami b'' w postaci tafelek i słupków.





